



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung auf Zytotoxizität der Pflanzen
Dianthus versicolor F. und *Potentilla anserina* L.

Verfasserin

Claudia Schmid

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

**Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis
macht, dass ein Ding kein Gift ist.**

Philippus Theophrastus Paracelsus (1493 - 1541)

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin, Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Lemmens-Gruber, für die Vergabe des Diplomarbeitsthemas bedanken. Durch meine Vollzeitbeschäftigung hat sich die Abgabe immer wieder verzögert. Aus diesem Grund danke ich Ihnen für das Verständnis und für die entgegengebrachte Geduld.

Frau Rawnduzi hat mich während meiner praktischen Arbeit im Labor immer unterstützt und ist mir bei Fragen und Problemen stets hilfsbereit zur Seite gestanden. Vielen Dank deshalb auch an Frau Rawnduzi.

Frau Univ.-Prof. Dr. Glasl-Tazreiter und Frau Dr. Prinz vom Department für Pharmakognosie danke ich für die zur Verfügung gestellten Unterlagen.

Bei meinen Studienkollegen, Andrea, Birgit, Eva und Guido möchte ich mich für die gemeinsame Studienzeit bedanken. Es war eine schöne und durchaus bereichernde Zeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt vor allem meinen Eltern, die mich jederzeit und in jeglicher Hinsicht stets unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Pflanzenheilkunde (Phytotherapie).....	3
2.2	Traditionelle mongolische Medizin	3
2.2.1	Grundsätze der traditionellen mongolischen Medizin	5
2.2.2	Forschung der traditionellen mongolischen Medizin	6
2.3	<i>Dianthus versicolor</i> FISCH	7
2.3.1	Systematik	8
2.3.2	Morphologischer Aufbau.....	9
2.3.3	Eigenschaften.....	10
2.3.4	Inhaltsstoffe	10
2.3.5	Verwendung	16
2.4	<i>Potentilla anserina</i> L.	20
2.4.1	Systematik.....	20
2.4.2	Morphologischer Aufbau.....	21
2.4.3	Inhaltsstoffe	22
2.4.4	Verwendung	23
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Pflanzenmaterial von <i>Dianthus versicolor</i>	26
3.1.1	Herstellung des „Original Water Extract“	26
3.2	Pflanzenmaterial von <i>Potentilla anserina</i>	26
3.2.1	Herstellung der H ₂ O-Extrakte und der hydro-ethanolischen Extrakte	27
3.2.2	Herstellung des MeOH 40% Rohextraktes	28
3.2.3	Herstellung der Fraktionen	28
3.2.4	Lösungsmittel/Löslichkeit.....	29
3.3	Die Caco-2 Zelllinie	30
3.3.1	α-MEM-Zellkulturmedium	31
3.3.2	FCS (fetales Kälberserum)	31
3.3.3	Trypsin.....	32
3.4	Versuchsdurchführung	32
3.4.1	Kultivierung der Zellen.....	32
3.4.2	Mediumwechsel.....	33
3.4.3	Passagierung.....	34
3.4.4	Bestimmung der Zellzahl	35
3.4.5	Ansetzen der 96-well Platten.....	37
3.4.6	Inkubation der Zellen mit dem Pflanzenmaterial	38
3.4.6.1	Inkubation mit <i>Dianthus versicolor</i>	38
3.4.6.2	Inkubation mit <i>Anserinae herba</i>	38

3.4.6.3	Beschickung der 96-well Platte	40
3.4.7	Messung und Auswertung der Platten	40
3.5	Verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien und Software	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Lösungsmittel DMSO	44
4.2	Lösungsmittel Tween 80	45
4.3	<i>Dianthus versicolor</i>	47
4.4	Wasserlöslicher Extrakt 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	48
4.5	Wasserlöslicher Extrakt 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	50
4.6	Hydro-ethanolischer Extrakt 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> , gelöst in DMSO	51
4.7	Hydro-ethanolischer Extrakt 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> , gelöst in DMSO	53
4.8	Hydro-ethanolischer Extrakt 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> , gelöst in Tween 80	54
4.9	Hydro-ethanolischer Extrakt 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> , gelöst in Tween 80	56
4.10	Rohextrakt der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	57
4.11	Fraktion 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	59
4.12	Fraktion 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	60
4.13	Fraktion 3 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	62
4.14	Fraktion 4 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	64
4.15	Fraktion 5 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	66
5	Diskussion der Ergebnisse	68
5.1	<i>Dianthus versicolor</i>	68
5.2	<i>Potentilla anserina</i>	69
6	Schlussbetrachtung.....	72
7	Zusammenfassung.....	74
8	Summary	76
9	Literaturverzeichnis	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mongolei	8
Abb. 2: <i>Dianthus versicolor</i> F.	10
Abb. 3: Grundgerüst Flavan	12
Abb. 4: Strukturformel Chrysoeriol	14
Abb. 5: Triterpensaponine in <i>Dianthus versicolor</i> – 7 neue Substanzen	15
Abb. 6: Graphische Darstellung der Wirkung der Wasserextrakte von <i>Saussurea amara</i> , <i>Lilium pumilum</i> und <i>Dianthus versicolor</i> auf den Gallenfluss	17
Abb. 7: Graphische Darstellung der Wirkung des Drogenextraktes auf die untersuchten Organpräparate	19
Abb. 8: <i>Potentilla anserina</i> L.	21
Abb. 9: Caco-2 Zellen	31
Abb. 10: Einteilung der Neubauer-Zählkammer	36
Abb. 11: Äußeres Quadrat der Zählkammer	37
Abb. 12: Graphische Darstellung der Wirkung von DMSO auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	44
Abb. 13: Graphische Darstellung der Wirkung von Tween 80 auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	45
Abb. 14: Graphische Darstellung der Wirkung des Original Water Extract (OWE) von <i>Dianthus versicolor</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	47
Abb. 15: Wasserlöslicher Extrakt 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i>	48
Abb. 16: Graphische Darstellung der Wirkung des wasserlöslichen Extraktes 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	50
Abb. 17: Graphische Darstellung der Wirkung des in DMSO gelösten Extraktes 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	51
Abb. 18: Graphische Darstellung der Wirkung des in DMSO gelösten Extraktes 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	53
Abb. 19: Graphische Darstellung der Wirkung der in Tween 80 gelösten Droge 1 von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	54
Abb. 20: Graphische Darstellung der in Tween 80 gelösten Droge 2 von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	56
Abb. 21: Graphische Darstellung der Wirkung des Rohextraktes von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	57
Abb. 22: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 1 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	59
Abb. 23: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 2 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	60
Abb. 24: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 3 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	62
Abb. 25: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 4 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	64
Abb. 26: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 5 der Droge von <i>Potentilla anserina</i> auf das Wachstum der Caco-2 Zellen	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Systematik.....	9
Tab. 2: Saponine in <i>Dianthus versicolor</i> F.	15
Tab. 3: Systematik.....	20
Tab. 4: Beschreibung der Drogenherkunft, Kontroll/Chargennummer, Extraktbezeichnung und des Drogen-Extrakt-Verhältnisses	27
Tab. 5: Herstellung der Fraktionen.....	28
Tab. 6: Lösungsverhalten der Extrakte und Fraktionen	30
Tab. 7: Bedingungen im Inkubator	33
Tab. 8: Erstellung der Konzentrationen.....	38
Tab. 9: Berechnung der Stocklösung	39
Tab. 10: Erstellung der Konzentrationen.....	39
Tab. 11: Darstellung der 96-well Platte mit den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100	40
Tab. 12: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	44
Tab. 13: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	44
Tab. 14: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	45
Tab. 15: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	46
Tab. 16: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	46
Tab. 17: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	47
Tab. 18: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	47
Tab. 19: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	48
Tab. 20: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	49
Tab. 21: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	49
Tab. 22: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	49
Tab. 23: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	50
Tab. 24: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	50
Tab. 25: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	51

Tab. 26: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	52
Tab. 27: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	52
Tab. 28: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	52
Tab. 29: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	53
Tab. 30: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	53
Tab. 31: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	54
Tab. 32: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	55
Tab. 33: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	55
Tab. 34: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	56
Tab. 35: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	56
Tab. 36: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	57
Tab. 37: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	58
Tab. 38: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	58
Tab. 39: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	59
Tab. 40: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	59
Tab. 41: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	60
Tab. 42: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	61
Tab. 43: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	61
Tab. 44: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	61
Tab. 45: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	62
Tab. 46: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	62

Tab. 47: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	63
Tab. 48: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	64
Tab. 49: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	64
Tab. 50: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	65
Tab. 51: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle	66
Tab. 52: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 6 h	66
Tab. 53: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h	67
Tab. 54: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abw.	Abweichung
Caco-2 Zellen	Humane Adenokarzinom-Zellen („Colon carcinoma cells“)
CO ₂	Kohlendioxid
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
EZ4U	Easy for You (Name des Zellproliferationstests)
FCS	Fetales Kälberserum („Fetal calf serum“)
g	Gramm
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
Ink.	Inkubation
Kap.	Kapitel
KI	Konfidenzintervall
Kontr.	Kontrolle
Konz.	Konzentration
l	Liter
LM	Lösungsmittel
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
N	normal
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OWE	Original-Wasser-Extrakt („Original water extract“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („Phospat buffered saline“)
Pot.	Potentilla
S.	Seite
Tab.	Tabelle
TMM	Traditionelle Mongolische Medizin
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

1 Einleitung und Fragestellung

Seit Jahrtausenden werden Pflanzen zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt. Obwohl sich im 19. Jahrhundert die Herstellung von synthetischen Arzneistoffen entwickelte, ging die Bedeutung der Pflanzenheilkunde nie ganz verloren und wurde bis in unsere heutige Zeit überliefert, erhalten sowie weiterentwickelt.

Die traditionelle mongolische Medizin stellt eine ausgezeichnete Methode dar, die westliche Medizin zu ergänzen. Die traditionelle Medizin sieht den menschlichen Körper als Gesamtheit. Krankheit wird als die Konsequenz eines Ungleichgewichts zwischen den lebenserhaltenden Prinzipien, im mongolischen „hi“ (Atem), „sar“ (Galle) und „bagdan“ (Schleim), gesehen.

In der TMM werden der Heilpflanze *Dianthus versicolor* F. bestimmte Eigenschaften zugeschrieben, welche die drei lebenserhaltenden Prinzipien im Körper beeinflussen. Bisher gibt es jedoch nur sehr wenig wissenschaftliche Informationen über die Droge *Dianthus versicolor* F.

In den letzten Jahren wurde das Interesse auch im Westen immer größer und die Wissenschaft befasste sich immer mehr mit der Isolation von Stoffen sowie mit der Wirkungsweise dieser mongolischen Heilpflanze. Seit 1998 herrscht eine Kooperation zwischen der Health Sciences University of Mongolia und dem Department für Pharmakognosie der Universität Wien.

Dianthus versicolor zählt zur Familie der Nelkengewächse, wobei diese Pflanze eine von fünf Arten der Gattung *Dianthus* ist, die in der Mongolei wächst. Zusammen mit anderen mongolischen Pflanzen wird sie in der TMM gegen Lebererkrankungen verwendet. In der Mongolei findet sie zudem auch als Kontraktionsmittel der Gebärmutter Anwendung.

Potentilla anserina L. gehört zur Familie der Rosaceae und ist vor allem unter dem Namen „Gänsefingerkraut“ bekannt. Sie wächst in den gemäßigten und

kalten Zonen der gesamten Nordhemisphäre. Seit Jahrhunderten wird sie bei Dysmenorrhö, bei Mund- und Rachenentzündungen sowie als appetitanregendes und verdauungsförderndes Mittel angewendet. Es konnten zudem antimikrobielle sowie antimykotische Wirkungen nachgewiesen werden. Spasmolytische Wirkungen wurden nur teilweise und auch nur in geringen Maßen festgestellt. Aktuelle Untersuchungen fehlen hier.

Das Interesse an Phytotherapie stieg in den letzten Jahren immer weiter an. Es stellt sich die Frage, ob nur die positiven Eigenschaften hervorgehoben werden und mögliche Nebenwirkungen außer Acht gelassen werden? Schon Paracelsus, (Arzt, Alchemist, Mystiker und Philosoph) war der Meinung, dass alles Gift sei, nur die Menge sei ausschlaggebend. Es gibt wenig kritische Forschungen über Heilpflanzen. Ich bin der Ansicht, dass auch Heilpflanzen bei hohen Konzentrationen eine toxische Wirkung entfalten könnten.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Heilpflanzen *Dianthus versicolor* und *Potentilla anserina*, anhand von zytotoxischen Tests, geprüft. Wasserlösliche und hydro-ethanolische *Potentilla*-Extrakte sowie aus *Anserinae herba* hergestellte Fraktionen als auch ein Rohextrakt, wurden bei den Versuchen auf mögliche negative Zellveränderungen untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, alle Versuche mithilfe des Caco-2 Zellmodells, die zu den intestinalen Epithelzelllinien gehören, durchzuführen.

Es wurde hierzu besonders der Frage: *Welche Rolle spielt die Konzentration bei der Entstehung von Toxizität?* auf den Grund gegangen, um herauszufinden, ob die Extrakte und Fraktionen zytotoxisch wirken und ob die Konzentration als auch die Inkubationszeit einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Fraglich war nun, ob die Wirkung auf das Zellwachstum durch unterschiedliche Aufbereitungen eine andere ist.

Aufbauend wurde die Wirkung der von mir untersuchten Präparate beschrieben und meine Untersuchungsergebnisse präsentiert sowie diskutiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Pflanzenheilkunde (Phytotherapie)

Seit Jahrtausenden werden vorwiegend Pflanzen - neben wenigen tierischen und mineralischen Produkten - zur Therapie von Krankheiten verwendet. Im 19. Jahrhundert hatten Chemiker die ersten synthetischen Arzneistoffe hergestellt. 1888 wurde dann der erste synthetisch hergestellte Wirkstoff, Phenazon, als Antipyrin eingeführt und ein Jahr später dann die Acetylsalicylsäure als Aspirin. Trotz der schlagartigen Entwicklung der synthetischen Arzneistoffe im 20. Jahrhundert ging die Bedeutung der Pflanzenheilkunde nie völlig verloren. Sie wurde bis in die heutige Zeit überliefert, erhalten und weiterentwickelt [WICHTL, 2009].

Pflanzliche Arzneimittel können eingeteilt werden in solche, die wissenschaftlich belegt sind, die nur empirisch und traditionell begründet sind und schließlich solche, die als volksmedizinisch bezeichnet werden können, für die also eine Begründung fehlt [WICHTL, 2009].

2.2 Traditionelle mongolische Medizin

Die traditionelle mongolische Medizin stellt eine asiatisch, medizinische Tradition dar, die stark vom tibetischen Buddhismus beeinflusst wird. Jahrhundertlang wurde TMM in den bewohnten mongolischen Regionen angewendet [KLETTER et al., 2008].

Das mongolische Medizinsystem integriert einige Aspekte anderer medizinischen Methoden wie Ayurveda und die der chinesischen Medizin. Die traditionelle tibetanische Medizin wurde bei den Mongolen im 16. Jahrhundert eingeführt, als Lamaismus zur führenden Religion wurde [KLETTER et al., 2008].

Sie ist eine ausgezeichnete Methode, die westliche Medizin zu ergänzen. Neben der Heilung von Krankheiten, unterstützt sie die Selbstheilung und Gesundheit. Heute zählen viele Mongolen wieder eher auf die traditionelle, als auf die westliche Medizin. Auch in Europa wird die TMM immer häufiger angewendet. Meist werden Kräuter eingesetzt, die effektive und natürliche Inhaltsstoffe aufweisen. Bis etwa 1921 konnten westlich ausgebildete Ärzte problemlos mit traditionell ausgebildeten Ärzten in den medizinischen Einrichtungen, die von der damaligen russisch beeinflussten Regierung gegründet wurden, arbeiten. In den dreißiger Jahren, als die mongolische Regierung begann, wurde jegliche Praktizierung der traditionellen Medizin verboten. In Folge war es die westliche Medizin, die als einzige ausgeübt werden durfte [MUND, 2005].

Erst Ende der fünfziger Jahre war Forschung und Lehre der traditionellen mongolischen Medizin wieder erlaubt. Trotzdem war die traditionelle Medizin sehr populär und fast jeder verwendete sie heimlich, besonders bei chronischen Krankheiten [KLETTER et al., 2008].

All dieses Wissen wurde über Generationen hinweg mündlich weitergegeben. Bedauerlicherweise ging manches Wissen verloren, etwa indem Ärzte starben, ehe sie ihr Wissen an Studenten weitergeben konnten. Später wurden die Erkenntnisse in Manuskripten festgehalten, wie beispielsweise dem „Manuskript of Black Dom“ und „The Note of Black Dom“, die bis zur heutigen Zeit existieren. Viele andere sind durch Kriege oder Gesellschaftsprobleme verloren gegangen [MUND, 2005].

1959 wurde in Ulaan Baatar ein Labor für Studien zur traditionellen mongolischen Medizin gegründet, welches den Grundstein für das heutige Forschungszentrum bildet. Neben Diagnose und Behandlung von Krankheiten verfolgt dieses Zentrum diverse Ziele, wie zum Beispiel die Methodenlehre der traditionellen Medizin [MUND, 2005].

2.2.1 Grundsätze der traditionellen mongolischen Medizin

Die Grundlagen der traditionellen mongolischen Medizin folgen hauptsächlich den Richtlinien der tibetischen Medizin und des tibetischen Buddhismus. Der traditionellen Medizin entsprechend, wird der menschliche Körper als Gesamtheit betrachtet. Menschliche Gesundheit beruht auf dem Gleichgewicht zwischen den lebenserhaltenden Prinzipien, im Mongolischen genannt „hii“ (Atem), „sar“ (Galle) und „badgan“ (Schleim). Jegliche Störung im Gleichgewicht der drei Prinzipien resultieren aus einer Krankheit. Deshalb ist die Wiederherstellung des Gleichgewichts im Körper die erste Aufgabe des traditionellen Arztes [KLETTER et al., 2008].

Im Allgemeinen werden in der mongolischen Volksmedizin Störungen in „heiß“ und „kalt“ unterteilt. Grundsätzlich werden heiße Krankheiten mit Arzneimitteln behandelt, die eine kühlende Wirkung haben, während kalte Krankheiten eine Behandlung mit Medizin von wärmender Natur erfordern. Es ist zu berücksichtigen, dass heiße Krankheiten eine andere Zutatenmischung benötigen als Kalte. Der Grund hierfür ist, dass die Medizin sonst eine nachteilige Wirkung, anstelle von einer Vorteilhaften haben kann. Im Allgemeinen gibt es bei den Medikamenten einen Hauptinhaltsstoff, während die restlichen diesen in seiner Wirkung unterstützen [KLETTER et al., 2008].

Um eine Krankheit diagnostizieren zu können, prüft der Arzt den Puls, untersucht die Zunge, überprüft den Urin durch Geruch, Farbe und Geschmack und befragt den Patienten. Das Pulslesen ist das diagnostische, traditionelle Hauptwerkzeug, weil der Arzt den Typ der Krankheit (heiß oder kalt) sowie die Zustände der inneren Organe auf diese Art überprüfen kann. Der Arzt muss sehr erfahren sein, um den gesunden Puls von dem Puls zu unterscheiden, der eine spezifische Krankheit anzeigt. Die Therapie der Krankheit konzentriert sich zuerst auf Änderungen des Lebensstils. Weitere therapeutische Maßnahmen sind Medikation, Massagen, Aderlass, Dampfbäder, das Trinken von Mineralwasser, Akupunktur und Moxibustion [KLETTER et al., 2008].

Früher bereiteten traditionelle Ärzte die Medizin gemäß den Vorschriften oder auch nach eigenen Erfahrungen selbst zu. Mittlerweile hat sich die Herstellung von Medikamenten geändert. Ein großer Anteil der Arzneimittel wird jetzt in den Zentren der traditionellen Medizin sowie von mongolischen Gesellschaften erzeugt. Hierzu werden moderne Produktionsmethoden verwendet [KLETTER et al., 2008].

Arzneimittel werden in Form von Tabletten, Pillen und Aufkochungen hergestellt. Das Rohmaterial setzt sich aus Kräutern, Mineralien und tierischen Komponenten zusammen. Etwa 70% der Rohmaterialien stammen aus der Mongolei. 30% werden aus Indien, China und aus dem Mittleren Osten importiert [MUND, 2005].

Um Identität, Wirksamkeit und Sicherheit der Droge zu kontrollieren, wurden hierzu gesetzliche Rechtsverordnungen herausgegeben [KLETTER et al., 2008].

2.2.2 Forschung der traditionellen mongolischen Medizin

In der Vergangenheit behielt die Mongolei Verbindungen zu den sozialistischen Ländern - hauptsächlich in die ehemalige Sowjetunion – aufrecht und arbeitete mit ihnen in allen Gebieten der Wissenschaft zusammen. Durch den Zusammenbruch der Sowjetunion konnten die Mongolen von ihrem einst starken Nachbarn finanziell nicht mehr unterstützt werden. Solch ein Verlust von Finanzmitteln führte zu einem Rückschlag in den mongolischen Forschungstätigkeiten und neue Zusammenarbeiten mit anderen asiatischen Ländern und westlichen Universitäten wurden gesucht. Unter den neuen akademischen Partnern waren auch verschiedene Universitäten in Österreich. Einer dieser Partner ist die Abteilung der Pharmakognosie der Universität Wien. Seit 1998 herrscht eine Kooperation zwischen der Health Sciences University of Mongolia und dem Department für Pharmakognosie der Universität Wien. Die Forschungsarbeiten waren auf mongolische Pflanzen (unter anderem *Dianthus versicolor*) fokussiert, die für die traditionelle Behandlung gegen

Lebererkrankungen eingesetzt werden. Dieses gemeinsame Projekt hatte zum Ziel, die bioaktive Zusammensetzung und den therapeutischen Nutzen zu analysieren sowie mehr Informationen über die Botanik dieser Heilpflanzen zu erfahren [KLETTER et al., 2008].

2.3 *Dianthus versicolor FISCH*

Dianthus versicolor FISCH ist eine von fünf Arten der Gattung *Dianthus*, die in der Mongolei wächst. In folgenden Regionen wächst die Pflanze in der Mongolei:

- | | |
|-------------------|-------------------------------|
| 1. Khubsugul | 7. Mongolian Altai |
| 2. Khentei | 8. Middle Khalkha |
| 3. Khangai | 9. East Mongolia |
| 4. Mongol-Daurian | 10. Depression of Great Lakes |
| 5. Great Khingan | 11. Valley of Lakes |
| 6. Khobdo | 13. Gobi-Altai |

[GRUBOV, 2001]

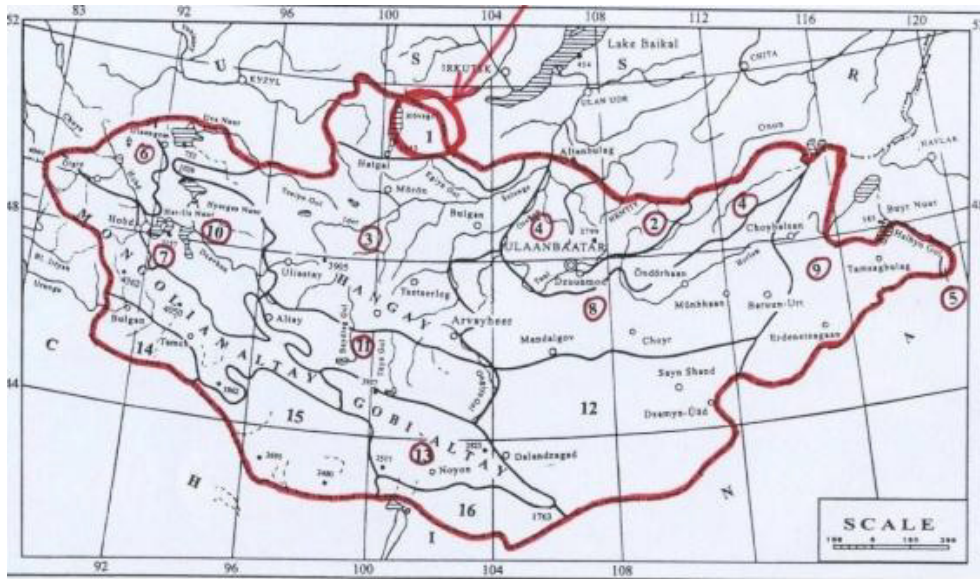


Abb. 1: Mongolei

modifiziert nach [GRUBOV, 2001]

Das für diese Arbeit verwendete Pflanzenmaterial wurde im Gebiet Khubsugul (wird auch als Hövsgöl bezeichnet) gesammelt. Auf der Landkarte ist dieses Gebiet mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die Pflanze wächst in der Steppe, auf Felsen sowie auf trockenem Kies [Ligaa et al., 2006].

2.3.1 Systematik

Die Gattung *Dianthus* zählt zur Familie der Nelkengewächse (Caryophyllaceae). Der Gattungsname *Dianthus* kommt aus dem Griechischen und ist aus den Wörtern „dios“ = Zeus und „anthos“ = Blüte zusammengesetzt, was soviel bedeutet wie Blume des Zeus [BÖHMIG und CHROBOK, 1963].

Klasse	Rosopsida
Unterklasse	Caryophyllidae
Ordnung	Caryophyllales
Familie	Caryophyllaceae
Gattung	<i>Dianthus</i>
Art	<i>Dianthus versicolor FISCH</i>

Tab. 1: Systematik

[FROHNE UND JENSEN, 1998]

2.3.2 Morphologischer Aufbau

Es handelt sich um eine mehrjährige, krautige Pflanze mit kräftigen Pfahlwurzeln und rauen, kahlen, ziemlich kurzen, verzweigenden und aufrechten 20 bis 50 cm hohen Stängeln. Die Blätter sind 13 bis 18 mm lang und 3 bis 7 mm breit, welche eine lanzettliche und flache Form aufweisen. Die Blüten stehen einzeln oder in Zweiergruppen bis hin zu Gruppen von jeweils 3 Blüten. Der Kelch ist 13 bis 18 mm lang, 3 bis 5 mm breit, ziemlich röhrig und oberseitig eher schmal. Das Petalum ist 20 bis 25 mm lang und weist eine himbeer-rosige Farbe auf. Der Blütenkelch ist 10 bis 12 mm lang, die Spitze ist nicht gleich gezähnt [Ligaa et al., 2006].



Abb. 2: *Dianthus versicolor* F.

[Kletter et al., 2008]

2.3.3 Eigenschaften

In der TMM werden *Dianthus versicolor* bestimmte Eigenschaften zugeschrieben, welche Einfluss auf die drei lebenserhaltenden Prinzipien im Körper haben. „Heiße“ Krankheiten können unter anderem mit *Dianthus versicolor* behandelt werden, da sie kühlende Eigenschaften aufweisen. Wie bereits angeführt, werden „heiße“ Krankheiten mit kalten und „kalte“ Krankheiten mit wärmenden Wirkstoffen therapiert. Der Geschmack ist bitter und die Eigenschaften können als kühlend, rau, stumpf und leicht beschrieben werden [KLETTER et al., 2008].

2.3.4 Inhaltsstoffe

Über *Dianthus versicolor* sind nur sehr wenig wissenschaftlich dokumentierte Informationen vorhanden. Der chemische Aufbau der Pflanze wurde bisher nicht ausreichend untersucht, so sind Publikationen über die Phytochemie und über die biologische Aktivität nur sehr spärlich vorhanden [OBMANN et al., 2011].

Seit einigen Jahren befasst sich die Wissenschaft immer mehr mit der Isolation von Stoffen dieser Pflanze.

Flavonoide scheinen eine relevante Gruppe von Verbindungen für diese Gattung zu sein, wie mehrere Veröffentlichungen vom Ende der siebziger Jahre bis jetzt zeigen [OBMANN et al., 2011].

Flavonoide kommen in allen höheren Pflanzen als Farbstoffe vor. Der Name stammt vom lateinischen Wort „flavus“ (=gelb). Flavonoide stellen eine Gruppe von Pigmenten dar, die für die Färbung von Früchten und Blüten verantwortlich sind [HABERMEHL et al., 2008].

Über 8000 verschiedene Verbindungen sind bekannt, werden jedoch in folgende Untergruppen eingeteilt:

- Flavanole
- Flavanone
- Flavone
- Flavonole
- Isoflavonoide
- Anthocyane (Überbegriff für Anthocyanidine und Anthocyanine)

Flavonoide zählen zu den phenolischen Substanzen. Der Grundkörper ist der Flavan-Kern, der aus 15 Kohlenstoffatomen besteht und in drei Ringe (A, B und C) aufgeteilt ist. Im Allgemeinen kommen Flavonoide als Glykoside vor [PIETTA, 2000].

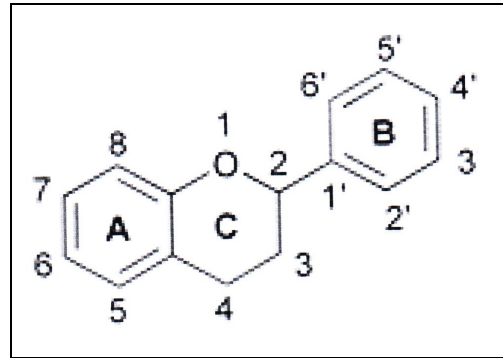


Abb. 3: Grundgerüst Flavan

Flavonoide besitzen folgende Merkmale:

- antikanzerogen
- antioxidativ
- immunmodulierend
- entzündungshemmend
- antithrombotisch
- blutdrucksenkend
- blutzuckersenkend
- antimikrobiell

[SCHEK, 2009]

2011 wurden am Institut für Pharmakognosie der Universität Wien in Kooperation mit dem Institut der pharmazeutischen Wissenschaft der Universität Graz und der Health Sciences University of Mongolia aus einem wässrigen Extrakt der oberirdischen Teile der Pflanze *Dianthus versicolor* F. folgende 18 Flavonoide identifiziert:

- Isoorientin-7-O-Rutinosid
- Isoorientin-7-O-Rhamnosyl-Galactosid
- Isovitexin-7-O-Rutinosid
- Isovitexin-7-O-Rhamnosyl-Galactosid

- Isoscoparin-7-O-Rutinosid
- Isoscoparin-7-O-Rhamnosyl-Galactosid
- Isoscoparin-7-O-Galactosid
- Isoorientin-7-O-Galactosid
- Isovitexin-7-O-Glucosid (Saponarin)
- Isovitexin-2“-O-Rhamnosid
- Apigenin-6-Glucosid (Isovitexin)
- Luteolin-7-O-Glucosid
- Apigenin-7-O-Glucosid
- Luteolin
- Apigenin
- Chrysoeriol
- Diosmetin
- Acacetin

Diese Zusammensetzungen scheinen für die günstige Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt verantwortlich zu sein.

Saponarin und Luteolin-7-O-Glucosid konnten bereits in anderen Arten der Gattung *Dianthus* identifiziert werden. Alle anderen Flavonoide wurden zum ersten Mal aus dem Pflanzenmaterial isoliert [OBMANN et al., 2011].

In einer älteren Publikation aus dem Jahr 1983, wurde aus *Dianthus versicolor* das Flavonoid Chrysoeriol (6-C-Glycosid) isoliert. Es war das erste Mal, dass ein 6-C-Glycosid aus der Pflanzenfamilie der Caryophyllaceae entdeckt wurde. Bisher war Chrysoeriol in der Literatur unter dem Namen Isoscoparin bekannt [BOGUSLAVSKAYA et al., 1983].

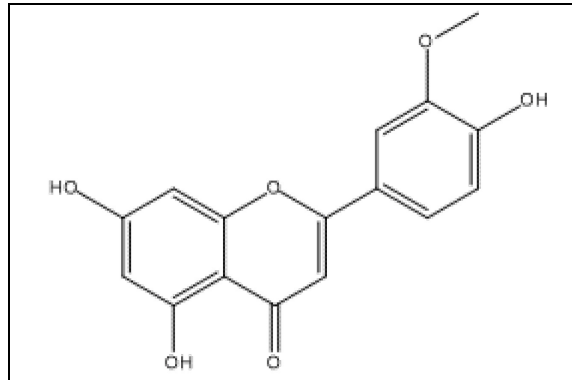


Abb. 4: Strukturformel Chrysoeriol

Die sekundären Pflanzenstoffe zählen zu den bioaktiven Substanzen, bei denen nicht nur der Nährstoffcharakter im Mittelpunkt steht, sondern vor allem die gesundheitsfördernden Wirkungen [SCHEK, 2009].

Ein in China durchgeführtes Forschungsprojekt konnte aus *Dianthus versicolor* Triterpensaponine erforschen. Von den oberirdischen Pflanzenteilen konnten 16 Saponine isoliert werden, davon sieben neue Substanzen. Die bereits bekannten Saponine wurden anhand von physikalischen und spektroskopischen Analysen identifiziert. Die neu entdeckten Strukturen Dianversicosides A – G konnten durch Spektroskopie und chemischen Analysen bestimmt werden [MA et al., 2009].

Neun bekannte Saponine	Sieben neue pentazyklische Triterpensaponine
Dianchinenoside A	Dianversicosides A
Dianchinenoside B	Dianversicosides B
Dianchinenoside C	Dianversicosides C
Dianchinenoside D	Dianversicosides D
Dianoside G	Dianversicosides E
Dianoside H	Dianversicosides F
Vaccaroid A	Dianversicosides G
Vaccaroid C	
Hainanenside	

Tab. 2: Saponine in *Dianthus versicolor* F.

[MA et al., 2009]

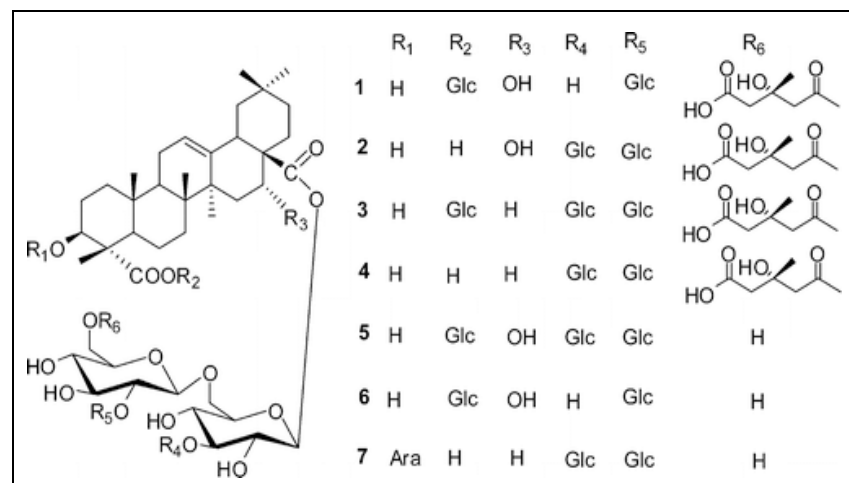


Abb. 5: Triterpensaponine in *Dianthus versicolor* – 7 neue Substanzen

[MA et al., 2009]

Als Saponine werden Glykoside hydrophober Alkohole benannt. Je nach der chemischen Konstitution des Aglykons spricht man von Triterpensaponinen oder Steroidsaponinen [NUHN, 2006].

Die Aglykone (Sapogenine) der Triterpensaponine bestehen aus 30 C-Atome, die entweder tetrazyklisch oder pentazyklisch angeordnet sind [ADAM et al., 2009].

Sie kommen vorrangig in zweikeimblättrigen Pflanzen vor, so in den Familien Caryophyllaceae (*Dianthus versicolor*), Araliaceae, Hippocastanaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Chenopodiaceae oder Fabaceae [NUHN, 2006]. Folgende Eigenschaften weisen Saponine auf:

- antikanzerogen
- immunmodulierend
- cholesterinsenkend
- antimikrobiell

[SCHEK, 2009]

2.3.5 Verwendung

Dianthus versicolor F. ist in der TMM eine altbekannte Heilpflanze. Im September 2007 wurde von der WHO eine Marktforschung bezüglich traditioneller mongolischer Heilpflanzen durchgeführt. Laut des „Report of market research on Mongolian traditional medicinal drugs“ zählt *Dianthus versicolor* zu einer der 45 meist bekannten inländischen Pflanzendrogen, welche in der Mongolei gehandelt wird. Mit einem durchschnittlichen, heimischen Marktpreis von etwa 3 Euro pro Kilogramm, zählt sie damit zu einer der teuersten, inländischen Drogen in der Mongolei [OBMANN et al., 2011].

Diese in China wichtigen Heilkräuter sind dort bekannt als „Jumai“ und werden als Diuretikum sowie als entzündungshemmendes Mittel genutzt. Es wird auch

bei der Behandlung von Harnwegsinfektionen, bei Karbunkeln sowie bei Karzinomen eingesetzt [MA et al., 2009].

Dianthus versicolor wird in der TMM, zusammen mit anderen mongolischen Pflanzen, gegen Lebererkrankungen verwendet [OBMANN et al., 2007].

Am Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien wurden die Pflanzen *Dianthus versicolor*, *Saussurea amara* sowie *Lilium pumilum* anhand eines Leberperfusionstest in drei unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre choleretische Wirkung getestet. Eine Arzneipflanze soll eine möglichst hohe choleretische sowie keinerlei zytotoxische Wirkung haben, um als Lebertherapeutikum eingesetzt werden zu können [MAYR, 2006].

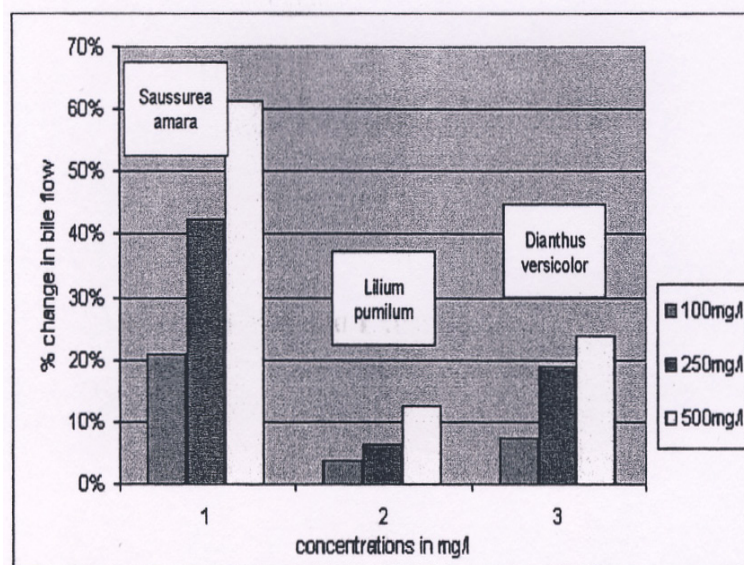


Abb. 6: Graphische Darstellung der Wirkung der Wasserextrakte von *Saussurea amara*, *Lilium pumilum* und *Dianthus versicolor* auf den Gallenfluss

[MAYR, 2006]

Wie man in der obigen Abbildung erkennen kann, fördern alle drei Pflanzen den Gallenfluss. Von den getesteten Wasserextrakten zeigte aber *Saussurea amara* die höchste choleretische Wirkung [MAYR, 2006].

In einer aktuelleren Studie von 2010 wurden wässrige und methanolische Extrakte der mongolischen Heilpflanzen *Dianthus versicolor* F. und *Lilium pumilum* D. im Rattenleberperfusionsmodell ebenfalls auf ihre Wirkung auf den Gallenfluss untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die wässrigen als auch die methanolischen Extrakte beider Pflanzen eine deutlich ausgeprägte Anregung der Gallensekretion bewirken. Der Mechanismus hinter dieser choleretischen Wirkung bleibt unklar. Der erhöhte Gallenfluss könnte durch einen verstärkten osmotischen Druck der Extrakte verursacht werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich. Im Mikroskop konnten keine akuten, toxischen Effekte der Extrakte auf die Leber festgestellt werden [OBMANN et al., 2010].

In der Mongolei wird *Dianthus versicolor* auch als Kontraktionsmittel der Gebärmutter verwendet. Es wird nach der Geburt empfohlen, um den Rest der Plazenta zu entfernen sowie während des Wochenflusses. Es werden nur die oberirdischen Anteile der Pflanze *Dianthus versicolor* verwendet. Wässrige Auszüge werden erfolgreich bei Menschen und Tieren angewendet. Um diese Aussage zu bestätigen, wurde am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien die Wirkung eines Extraktes aus der Droge *Dianthus versicolor* an isolierten Organpräparaten von Meerschweinchen, wie des Uterus, der Aorta, der Aorta pulmonalis, des Papillarmuskels, des spontan schlagenden rechten Vorhofs sowie des terminalen Ileums, untersucht. An drei verschiedenen Konzentrationen wurde die Wirkung des wässrigen Extrakts auf Kontraktilität und Schlagfrequenz der Organpräparate geprüft [OBMANN et al., 2009].

Die zu erwartende kontraktile Wirkung des untersuchten Extraktes aus *Dianthus versicolor* konnte bestätigt werden. Man stellte in den Versuchsreihen fest, dass die Wirkung des Extraktes reversibel ist [OBMANN et al., 2009].

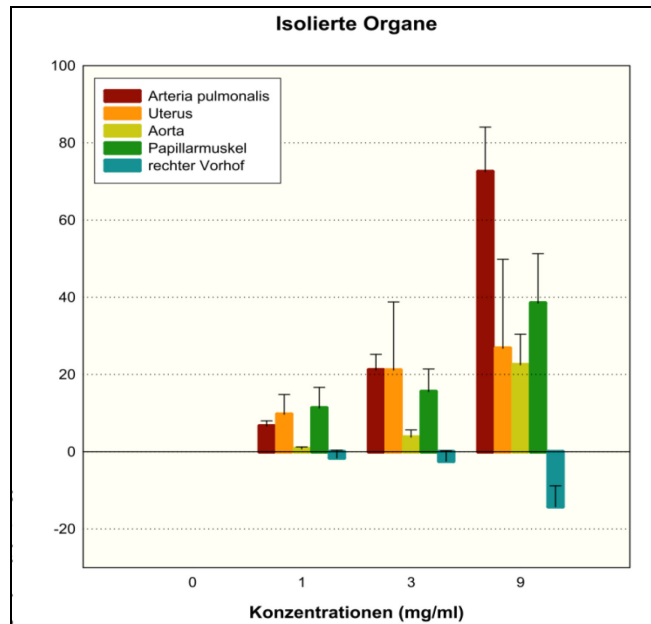


Abb. 7: Graphische Darstellung der Wirkung des Drogenextraktes auf die untersuchten Organpräparate

[WEISZ-PECHER, 2008]

In dieser graphischen Abbildung ist die prozentuelle Zunahme der Kontraktionskraft der untersuchten Organpräparate bzw. die prozentuelle Abnahme der Schlagfrequenz des rechten Vorhofs durch die Einwirkung des Drogenextraktes ersichtlich [WEISZ-PECHER, 2008].

In mongolischer Literatur wird erläutert, dass das Dekokt des oberirdischen Teils als komplette Therapie bei hohem Blutdruck und möglicherweise auch gegen Blutverlust nach der Geburt oder starker Blutung während der Menstruation verwendet werden kann. Insbesondere in der mongolischen und tibetischen Medizin wird *Dianthus versicolor* F. als Bestandteil eines Medikaments zur Behandlung bei Komplikationen nach der Geburt eingesetzt. In Süd- und Ostrussland erfolgt die Anwendung bei Krämpfen, Ohnmacht und Epilepsie sowie zur Stoppung von Durchfall, zur Entgiftung bei Schlangenbissen und bei Herzklopfen. Es wird zudem als entzündungshemmendes und blutdrucksenkendes Mittel genutzt [Ligaa et al., 2006].

2.4 *Potentilla anserina* L.

Der Gattungsname *Potentilla* leitet sich vom lateinischen *potens* (mächtig) ab und weist damit auf die heilkräftige Wirkung der Pflanze hin [TOMCZYK und LATTE, 2009].

Sie kommt in den gemäßigten und kalten Zonen der gesamten Nordhemisphäre vor. In Europa ist die Pflanze südlich bis zu den Azoren, nach Nordportugal, Mittelspanien, Südfrankreich bis nach Oberitalien verbreitet. In den Alpen ist sie etwas seltener, im eigentlichen Mittelmeergebiet wie auch in den südlichen Balkanländern fehlt sie zur Gänze. Im Osten wächst das Kraut im Kaukasus, Libanon und im Himalaya. Sie kommt zum Teil aber auch in Amerika sowie in Südastralien vor [HÄNSEL et al., 1994].

Ihre natürlichen Lebensräume sind Meeresküsten, Seen und Flüsse, aber man findet das Gänsefingerkraut auch häufig an Wegrändern, Weiden und Wiesen [ERIKSSON, 1985]

2.4.1 Systematik

Klasse	Rosopsida
Unterklasse	Rosidae
Ordnung	Rosales
Familie	Rosaceae
Gattung	<i>Potentilla</i>
Art	<i>Potentilla anserina</i> L.

Tab. 3: Systematik

[FROHNE und JENSEN, 1998]

Der wohl bekannteste Name dieser Pflanze ist das Gänsefingerkraut, wobei viele weitere volkstümliche Namen für *Potentilla anserina* existieren wie

beispielsweise Anserine, Gänsefinger, Handblatt oder aber auch Silberkraut, Martinshand, Krampfkraut [FISCHER und KRUG, 1984].



Abb. 8: *Potentilla anserina* L.

[WICHTL, 2009]

2.4.2 Morphologischer Aufbau

Es handelt sich um ein mehrjähriges, niedriges Kraut, das sich über Ausläufer vermehrt. Dieses Rosengewächs bildet Blattrosetten und ist an den Knoten wurzelnd. Die Blätter haben ein gefiedertes, gesägtes Aussehen, wobei die Unterseite silbrig-seidig behaart ist. Die dunkelgrüne Oberseite ist vergleichsweise meist etwas weniger behaart [SCHÖNFELDER und SCHÖNFELDER, 2004; WYK et al., 2004].

Blüten mit 5 sonnengelben Kronblättern, die auf langen Stängeln stehen, sind charakteristisch für *Potentilla anserina* [SCHÖNFELDER und SCHÖNFELDER, 2004].

2.4.3 Inhaltsstoffe

Kraut und Wurzelstock weisen reichlich Gerbstoffe (Tannine), etwa 5 bis 10%, auf, hauptsächlich Ellagitannine [HÄNSEL et al., 1994].

Es gibt zwei verschiedene Arten von Gerbstoffen:

- Kondensierte Gerbstoffe - diese leiten sich von Flavan-3-olen (Catechine) ab
- Hydrolysierbare Gerbstoffe oder Gallotannine - diese leiten sich von der Gallussäure ab (hierzu zählen auch die Ellagitannine) [NUHN, 2006]

Verbindungen beider Gruppen zeichnen sich durch eine hohe Anzahl an phenolischen Hydroxygruppen aus [NUHN, 2006].

Mittels Papierchromatographie konnten im Blatthydrolysat die Flavonole Kämpferol, Myricetin, Quercetin sowie die Anthocyanidine Cyanidin und Leucodelphinidin nachgewiesen werden [HÄNSEL et al., 1994]

Flavonole zählen zu den Flavonoiden, welche bereits im Kap. 2.3.4 näher beschrieben wurden.

Im Kraut sind auch Phenolcarbonsäuren wie p-Cumar-, Ellag-, Ferula- und Kaffeesäure enthalten. Die Cumarine Scopoletin und Umbelliferon wurden aus den oberirdischen Teilen der Pflanze isoliert. Weiters konnten zahlreiche Fettsäuren (Arachin-, Cerotin-, Linol-, Linolen-, Myristin-, Öl- und Palmitinsäure) und Sterole, überwiegend β -Sitosterol, entdeckt werden. Der Ascorbinsäuregehalt des Krautes wird mit 300 bis 350 mg/100 g Frischgewicht angegeben [HÄNSEL et al., 1994].

TUNMANN und JANKA untersuchten die Droge und isolierten Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und Eisen sowie in wesentlich geringerer Konzentration Lithium und Mangan. Neben den anorganischen Bestandteilen wurden die stickstoffhaltigen Inhaltsstoffe Cholin, Glykokollbetain und Histidin erforscht.

Ammoniak wurde hier als einzige flüchtige Base nachgewiesen [TUNMANN und JANKA, 1955].

2.4.4 Verwendung

Als Droge werden die kurz vor oder während der Blüte gesammelten und getrockneten, ganzen oder zerkleinerten Blätter und Blüten verwendet. Bei der Lagerung muss auf Schutz vor Licht und Feuchtigkeit geachtet werden [HÄNSEL et al., 1994].

1-2 Teelöffel des Krautes werden mit einer Tasse kochendem Wasser übergossen. Dann lässt man den Tee für ungefähr 10 min ziehen, damit sich die Wirkstoffe gut entfalten können. Es wird empfohlen mehrmals täglich 1 Tasse zwischen den Mahlzeiten frisch zubereiteten Tee zu trinken bzw. mit dem lauwarmen Tee zu spülen oder zu gurgeln [SCHÖNFELDER und SCHÖNFELDER, 2004].

Potentilla anserina L. ist in der Volksmedizin schon sehr lange bekannt und wird bereits seit Jahrhunderten bei Dysmenorrhö sowie bei Mund-Rachenentzündungen oder auch als appetitanregendes und verdauungsförderndes Mittel angewendet [WICHTL, 2009].

Bei leichten, unspezifischen, akuten Durchfallerkrankungen wird die Droge unterstützend zur Therapie empfohlen. Durch den hohen Gerbstoffgehalt weist sie einen astringierenden Effekt auf [HÄNSEL et al., 1994].

Gerbstoffe bzw. Tannine sollen mehrere Enzyme, die für die metabolische Aktivierung von Mutagenen verantwortlich sind, hemmen. Außerdem sind sie durch antibakterielle und antioxidative Eigenschaften geprägt [SCHIMMER und LINDENBAUM, 1995].

Auch antivirale Wirkungen wurden beobachtet. So erwies sich ein Drogeninfus im Verhältnis 1:10 im Plaquehemmungstest als virustatisch und zytotoxisch

gegen Herpesvirus Hominis HVP 75 (Typ 2) und Vaccine-Virus [HÄNSEL et al., 1994].)

In China wird *Potentilla anserina* präventiv als auch zur Behandlung von HBV eingesetzt. Dieser positive Effekt wird einem Triterpensaponin zugeschrieben [ZHAO et al., 2008].

Die verschiedenen *Potentilla*-Arten, unter anderem *Potentilla anserina*, werden als eine der sichersten Astringentien in der Behandlung von Diarrhoe, Ruhr und Halsschmerzen beurteilt. Untersuchungen haben auch gezeigt, dass Verbindungen - von verschiedenen Teilen der Pflanze isoliert - eine mögliche antioxidative, hypoglykämische, entzündungshemmende, tumorhemmende sowie anti-ulcerogenische Wirkung haben [TOMCZYK et al., 2008].

In einer Studie aus dem Jahr 2008, konnten antimikrobielle sowie antimykotische Wirkungen nachgewiesen werden. Es wurde Blätter und Blüten analysiert, wobei sich herausstellte, dass die wässrigen *Potentilla*-Extrakte die stärkste antimikrobielle Wirkung gegen *Helicobacter Pylori* aufweisen. Es konnte eine Hemmung der grampositiven Bakterien, wie *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis*, bemerkt werden. Dabei ist anzumerken, dass die Blüten stärkere Effekte zeigten als die Blätter. Das Wachstum der gramnegativen Bakterien konnte jedoch nicht gehemmt werden. Die gleichen Ergebnisse wurden auch von Funatogawa et al. und Ruggiero et al. erzielt [TOMCZYK et al., 2008].

Außerdem werden dem Kraut spasmolytische und tonussteigernde Wirkungen zugeschrieben, die jedoch nicht eindeutig belegt sind, da die Ergebnisse verschiedener, älterer Arbeiten nicht übereinstimmen [HÄNSEL et al., 1994].

So wurde ein 10%iges, wässriges Dekokt an isolierter Rattenuterus- und Meerschweinchendünndarmmuskulatur untersucht. Es zeigte sich keine Wirkung des isolierten Gerbstoffes auf Peristaltik und Tonus, jedoch einen lähmenden und tonussenkenden Effekt, der durch vorhandene Ammoniumsalze

ausgelöst wurde sowie eine Tonuserhöhung und Anregung der Bewegungsleistungen, für die die Base Cholin verantwortlich gemacht wird [TUNMANN und JANKA, 1955].

An isolierten Meerschweinchenorganen wurden Extrakte aus *Potentilla anserina* auf toxische und spasmolytische Wirkungen getestet. In dieser Untersuchung konnte eine spasmolytische Wirkung nur teilweise und auch nur in geringen Maßen festgestellt werden. Toxische Effekte blieben völlig aus. Unklar ist, auf welche Inhaltsstoffe die leichten spasmolytischen Wirkungen zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse konnten nicht, wie erwartet, auf die in *Anserina herba* enthaltenen Flavonoide zurückgeführt werden [SCHLAGER, 2008].

Jedoch werden *Potentilla*-Fraktionen mit höher konzentrierten Wirkstoffen kritisch betrachtet. Eine toxische Wirkung kann deshalb nicht ausgeschlossen werden [SCHLAGER, 2008].

Es wurden kardiotoxische Wirkungen an Meerschweinchen und Katzen untersucht. Nach Infusion der Drogenextrakte kam es bei beiden Tierarten zum systolischen Herztod. Daten über die Toxizität nach peroraler Aufnahme fehlen jedoch [HÄNSEL et al., 1994].

3 Material und Methoden

Für diese Diplomarbeit wurden die Heilpflanzen *Dianthus versicolor* FISCH und *Potentilla anserina* L. untersucht.

3.1 Pflanzenmaterial von *Dianthus versicolor*

Das Pflanzenmaterial wurde im August 2004 in dem mongolischen Gebiet Khubsugul aufgesammelt (siehe Kap. 2.3). In dieser Arbeit wurden für alle Versuche ausschließlich Extrakte der oberirdischen Pflanzenteile von dieser Charge untersucht. Die Herstellung erfolgte am Department für Pharmakognosie der Universität Wien. Die Sammlung erfolgte unter der Leitung von Frau Dr. Christa Kletter.

3.1.1 Herstellung des „Original Water Extract“

Für die Herstellung des OWE wurde eine wässrige Extraktion durchgeführt. Diese setzte sich aus einem Teil Droge und 20 Teilen Wasser zusammen. Mit 0,1 N Trifluoressigsäure wurde die frisch gemahlene Droge auf einen pH-Wert von 2, welcher dem des Magens entspricht, eingestellt. Anschließend wurde eine Stunde am Wasserbad bei 40 °C unter leichtem Schütteln extrahiert [OBMANN et al., 2007].

Das wasserlösliche Extrakt wurde in Eprouvetten bereitgestellt. In jeder Epruvette waren im Mittel 502,72 mg/250 µl H₂O enthalten. Die Erstellung der Konzentrationen wird im Kapitel 3.4.6.1 genauer erläutert.

3.2 Pflanzenmaterial von *Potentilla anserina*

Die für die Zytotoxizitätsprüfungen verwendeten Drogenmuster waren unterschiedlicher Abstammung (Tab. 4). Die Herstellung erfolgte von Frau Dr. Sonja Prinz am Department für Pharmakognosie an der Universität Wien. Je Drogenmuster wurde ein H₂O-Extrakt und ein hydro-ethanolisches Extrakt

hergestellt. Zusätzlich wurden aus *Anserinae herba* 1 das Rohextrakt sowie noch weiter aufgereinigte Fraktionen (1-5) bereitet.

Nr.	Droge	Drogenherkunft/ Firma	Kontroll/ Chargen- nr.	Extrakt- bezeichnung	Droge- Extrakt- Verhältnis
1	<i>Potentillae anserinae herba</i>	<i>Herba anserina</i> DAC Mag. Kottas Heilkräuter A-1230 Wien	KLA00546	H ₂ O	5,3 : 1
			A106023	EtOH 70%	9,4 : 1
			-001	Rohextrakt MeOH 40%	3,28 : 1
2	<i>Potentillae anserinae herba</i>	<i>Herba anserinae</i> DAC Richter A-6330 Kufstein	KL- 418515/05	H ₂ O	4,7 : 1
			P102702	EtOH	6,0 : 1

Tab. 4: Beschreibung der Drogenherkunft, Kontroll/Chargennummer, Extraktbezeichnung und des Drogen-Extrakt-Verhältnisses

3.2.1 Herstellung der H₂O-Extrakte und der hydro-ethanolischen Extrakte

Zur Herstellung des H₂O-Extraktes wurden 50 g Droge mit 500 ml Wasser am Wasserbad 30 min unter Rückfluss erhitzt und nach der Filtration gefriergetrocknet. Um das hydro-ethanolische Extrakt zu erhalten, wurden 50 g Droge mit 500 ml Ethanol 70% 30 min unter Rückfluss erhitzt, darauffolgend filtriert. Die Filtrate wurden bis zur Entfernung des Ethanols unter vermindertem Druck eingengt und anschließend lyophilisiert.

3.2.2 Herstellung des MeOH 40% Rohextraktes

Um den Rohextrakt zu erhalten, wurden 60 g der gepulverten Droge mit 600 ml MeOH 40% für 30 min unter Rückfluss am Wasserbad erhitzt und nach anschließendem Abkühlen abgenutscht. Dieser Vorgang wurde wiederholt, jedoch für 20 min. Bis zur vollständigen Entfernung von Methanol wurden die vereinigten Filtrate unter vermindertem Druck eingeeengt und anschließend gefriergetrocknet.

3.2.3 Herstellung der Fraktionen

Zur Gewinnung der Fraktionen (1-5) wurde das Rohextrakt mittels Festphasenextraktion an C18-Kartuschen aufgereinigt. Dafür kamen Kartuschen folgenden Typs zum Einsatz: Bond Elut C18-Kartuschen 10 g, 60 ml der Fa. Varian. Um den Rohextrakt zu lösen, wurde es mit 280 ml des 20%igen Lösungsmittel MeOH versetzt. Pro Kartusche wurden davon je 28 ml aufgetragen. Nach anschließendem Trockensaugen wurde mit steigendem Prozentgehalt das Methanol herausgespült.

Erhaltene Fraktion	Lösungsmittel	Arbeitsschritt
Fraktion 1	Wasser	Elution 1
Fraktion 2	Methanol 20%	Elution 2
Fraktion 3	Methanol 40%	Elution 3
Fraktion 4	Methanol 60%	Elution 4
Fraktion 5	Methanol 100%	Elution 5

Tab. 5: Herstellung der Fraktionen

Nach dem Abdampfen des Methanols wurden die einzelnen Fraktionen lyophilisiert. In Fraktion 1 konnten anhand der Dünnschichtchromatographie hauptsächlich Phenolcarbonsäuren nachgewiesen werden. Die Fraktionen 2 – 4

enthalten überwiegend Flavonoide. Fraktion 5 enthält vor allem Ellagsäure und Chlorophyll.

3.2.4 Lösungsmittel/Löslichkeit

Die verschiedenen Extrakte und Fraktionen wiesen unterschiedliche Löslichkeit auf, daher musste für die nicht wasserlöslichen Substanzen ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden.

Die hydro-ethanolischen Extrakte und die Fraktionen 4-5 zeigten hydrophobe Eigenschaften und konnten deshalb im alleinigen Zellkulturmedium nicht gelöst werden. Diese wurden in dem Lösungsmittel DMSO gelöst und anschließend mit Medium auf 1000 µl aufgefüllt. Bei Dimethylsulfoxid, kurz DMSO, handelt es sich um ein farbloses organisches Lösungsmittel [SCHMITZ, 2007]. Für die hydro-ethanolischen Potentilla-Extrakte wurde auch Tween 80 (Polysorbat) als Lösungsvermittler verwendet. Tween 80 ist eine klare, gelbe, viskose Flüssigkeit, die zuerst im Verhältnis 1:2 in Ethanol gelöst wurde. Auch hier wurden die Extrakte zuerst im Lösungsmittel gelöst und anschließend mit Medium auf 1000 µl aufgefüllt.

Um eine mögliche Eigenwirkung der Löslichkeitsvermittler auszuschließen, mussten auch DMSO und Tween 80 + Ethanol auf Toxizität geprüft werden, um somit Verfälschungen der Ergebnisse zu verhindern. Mit Hilfe eines Ultraschallbades konnte das Lösungsverhalten der Substanzen verbessert und beschleunigt werden.

Droge	Verdünnungsmittel/ Lösungsmittel	Menge
Pot. 1, H ₂ O-Extrakt	α-Medium	1000 µl
Pot. 2, H ₂ O-Extrakt	α-Medium	1000 µl
Pot. 1, EtOH-Extrakt	DMSO + α-Medium	50 µl DMSO + 950 µl α-Medium
Pot. 2, EtOH-Extrakt	DMSO + α-Medium	50 µl DMSO + 950 µl α-Medium
Pot. 1, EtOH-Extrakt	Tween 80 + Ethanol + α-Medium	100 µl LM + 900 µl α-Medium
Pot. 2, EtOH-Extrakt	Tween 80 + Ethanol + α-Medium	200 µl LM + 800 µl α-Medium
Rohextrakt	α-Medium	1000 µl
Fraktion 1	α-Medium	1000 µl
Fraktion 2	α-Medium	1000 µl
Fraktion 3	α-Medium	1000 µl
Fraktion 4	DMSO + α-Medium	50 µl DMSO + 950 µl α-Medium
Fraktion 5	DMSO + α-Medium	50 µl DMSO + 950 µl α-Medium

Tab. 6: Lösungsverhalten der Extrakte und Fraktionen

Legende zu Tab. 6:

Pot. H₂O-Extrakt: es handelt sich jeweils um den wasserlöslichen Potentilla Extrakt

Pot. EtOH-Extrakt: steht für hydro-ethanolischer Potentilla-Extrakt, welcher wasserunlöslich ist und somit ein Lösungsmittel benötigt

DMSO: DMSO ist die Abkürzung für das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid, welches für alle wasserunlöslichen Extrakte und Fraktionen verwendet wurde

3.3 Die Caco-2 Zelllinie

Caco-2 Zellen gehören zu den intestinalen Epithelzelllinien. Sie wurden aus humanen Kolonkarzinomen isoliert [LINDL, 2008].

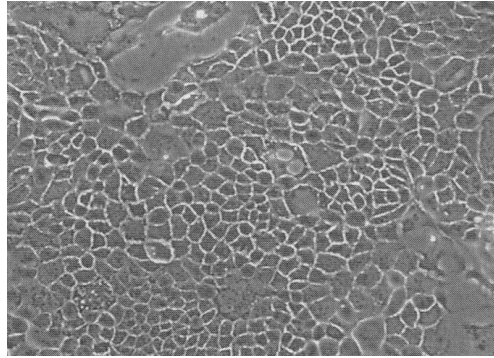


Abb. 9: Caco-2 Zellen

[LINDL, 2008]

3.3.1 α -MEM-Zellkulturmedium

MEM bedeutet minimum essential medium, ist ein Minimalmedium und neben anderen Arten von Medien ebenfalls eine Entwicklung von Harry Eagle. MEM ist für jede Art von Zellkultur geeignet. α -Medium ist ein abgewandeltes MEM, das 1971 entwickelt wurde. Das α -MEM unterscheidet sich von der MEM-Standardrezeptur durch zusätzliche Inhaltsstoffe: Vitamin B₁₂, Ascorbinsäure, nicht essentielle Aminosäuren, Pyruvat, Fettsäure und D-Biotin [SCHMITZ, 2007].

In dieser Diplomarbeit wurde α -Medium verwendet. Zur Kultivierung der Caco-2 Zellen wurde dem α -Medium 10% Kälberserum zugesetzt.

3.3.2 FCS (fetales Kälberserum)

Seren sind unerlässlich für die Zellkultivierung. Aus den verschiedensten Tierspezies kann man Seren gewinnen, fetales Kälberserum wird in der Zellkultur am häufigsten eingesetzt. Es wurden, je nach Bedarf der jeweiligen Zelllinie, 3-25% dem Medium zugesetzt. Der hohe Gehalt an Wachstumsfaktoren ist optimal für die in-vitro Kultivierung von Zellen. Fetales Kälberserum stammt von ungeborenen Rinderfeten [SCHMITZ, 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche mit fetalem Kälberserum durchgeführt.

Die Kultur mit tierischem Serum ist aber auch mit negativen Begleiterscheinungen behaftet, da viele unerwünschte Krankheitserreger durch das Serum in die Zellkultur gelangen können [SCHMITZ, 2007].

3.3.3 Trypsin

Trypsin wird aus dem Pankreas von Rindern oder Schweinen isoliert. Trypsin ist eine Endopeptidase, die Peptidbindungen vorwiegend bei den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Trypsin wird verwendet, um die Zellen von der Kulturunterlage abzulösen [SCHMITZ, 2007].

Trypsin wurde vor ihrer Anwendung mit PBS im Verhältnis von 1:10 verdünnt.

PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung, die den pH-Wert stabilisiert und für ein osmotisches Gleichgewicht sorgt [SCHMITZ, 2007].

3.4 Versuchsdurchführung

3.4.1 Kultivierung der Zellen

Um Kontaminationen mit Hefen, Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, wurden die gesamten Versuche in einer sterilen Werkbank mit Luftstrom (auch als Laminar Air Flow bezeichnet) durchgeführt. Sowohl 30 min vor Arbeitsbeginn als auch nach Versuchsende wurde die Werkbank mit ultravioletttem Licht bestrahlt. Alle Materialien, die sich nicht schon in der Sterilbank befanden, mussten mit 70%igen Alkohol desinfiziert werden. Auch die Hände wurden zu Beginn gründlich gewaschen und desinfiziert. Außerdem wurden Einweghandschuhe verwendet.

Das Nährstoffangebot wird durch ein entsprechendes Zellkulturmedium gewährleistet. Andere wichtige Faktoren, wie Temperatur, Luftfeuchte und CO₂-Konzentration müssen ebenfalls den erforderlichen Bedürfnissen entsprechen.

Im Brutschrank bzw. Inkubator herrschen ideale Bedingungen für das Zellwachstum.

Faktoren	Werte
Temperatur	37 °C
Relative Luftfeuchte	95%
CO ₂ -Gehalt	5%

Tab. 7: Bedingungen im Inkubator

Caco-2 Zellen wachsen als einschichtiger Zellrasen und können in Zellkulturflaschen optimal gezüchtet werden.

3.4.2 Mediumwechsel

Zelllinien benötigen für Wachstum und Vitalität regelmäßige Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37 °C nach einiger Zeit zerfallen. Die Zeitspanne zwischen den Mediumerneuerungen hängt von der Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselaktivität ab und erfolgt je nachdem alle 2-4 Tage.

Praktische Durchführung

- Kulturen werden auf mögliche Kontaminationen mikroskopiert, nur einwandfreie Kulturen werden weiterbearbeitet.
- Die im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmte Mediumflasche wird mit 70%igen Alkohol desinfiziert und anschließend in die Sterilbank gestellt.
- Eine Pasteurpipette wird in den Schlauch zur Saugflasche gesteckt und die Vakuumpumpe wird eingeschaltet. Es ist darauf zu achten, dass man mit der Spitze nirgendwo anstößt.
- Die Zellkulturflasche wird leicht geschwenkt, mit der Pipette wird schräg vom Boden das Medium völlig abgesaugt. Der Zellrasen soll mit der

Pipettenspitze nicht berührt werden, um somit den Monolayer nicht zu beschädigen.

- Die Pasteurpipette darf kein zweites Mal verwendet und muss entsorgt werden.
- Aus der Mediumflasche wird das Medium mit einer sterilen Pipette in das Gewebekulturgefäß pipettiert.
- Nach dem Mediumwechsel kommt das Kulturgefäß in den Brutschrank.

3.4.3 Passagierung

Die Passagierung wird auch als subkultivieren, trypsinisieren oder splitten bezeichnet.

Damit die Zellen optimal gedeihen können und ein Absterben verhindert werden kann, müssen die Zellen trypsinisiert werden. Dies erfolgt bei einer Konfluenz von ungefähr 80%.

Praktische Durchführung

- Zuerst muss die Trypsinlösung und das Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden.
- Das Medium wird aus der Zellkulturflasche abgesaugt.
- In kleine Flaschen wird 1 ml Trypsin pipettiert, in große ungefähr 2-2,5 ml. Die Flasche wird etwas geschwenkt, um die Trypsinlösung optimal zu verteilen. Die Trypsinlösung soll nicht zu lange einwirken, da sonst die Zellen geschädigt werden können.
- Die Trypsinlösung wird abgesaugt. Dadurch wird der Zellrasen gewaschen und noch vorhandenes Medium entfernt.
- Es wird nochmals 1 ml bzw. 2-2,5 ml Trypsinlösung hinzugefügt.
- Nun kommt die Zellkulturflasche für 5 min in den Brutschrank. Durch diesen Vorgang werden die Zellen von der Flaschenwand gut abgelöst.

- Die Flasche wird aus dem Brutschrank genommen und es erfolgt eine optische Kontrolle, ob sich die Zellen abgelöst haben. Die Ablösung ist im Mikroskop gut sichtbar. Falls noch Zellen haften, können sie durch leichtes Klopfen gelöst werden.
- Danach werden ungefähr 4 ml Medium in die Zellkulturflasche pipettiert. Auch die Flaschenwand muss gut mit Medium abgespült werden, damit sich noch anhaftende Zellen lösen können.
- Die Zellsuspension wird in ein Röhrchen transferiert und 5 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert.
- Durch das Zentrifugieren bildet sich ein Zellpellet. Die überstehende Lösung wird abgesaugt und das entstandene Zellpellet wird erneut mit etwa 4 ml Medium versetzt und gut durchmischt.
- Die gewonnene Zelllösung wird zum Weiterzüchten der Zellen verwendet. Dazu werden 2 ml von der Zelllösung zu 10 ml Medium in eine Zellkulturflasche übergeführt und in den Brutschrank gelegt. Es erfolgt ein Anheftungsprozess der Zellen. Die Flasche soll deshalb für 24 h nicht bewegt werden.

3.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Bevor die Zellen in 96-well Platten ausgesät werden, muss die Anzahl der Zellen in der Suspension bestimmt werden. Dazu wird ein Hämocytometer verwendet. Nach der Passagierung folgen folgende Schritte:

- Die Zellen werden 1:1 mit Trypanblau gefärbt, indem 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gut vermischt werden.
- Auf der Zählkammer wird ein Deckglas fixiert. In dem Spalt zwischen Zählkammer und Deckglas werden 10 µl der gefärbten Zellsuspension eingebracht.
- Nun werden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Tote Zellen wurden durch Trypanblau tiefblau gefärbt. Die lebenden Zellen sind im

Mikroskop als leuchtend hell zu sehen. Trypanblau hat nach einer zu langen Einwirkzeit eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Aus diesem Grund muss dieser Teil des Versuches sehr rasch durchgeführt werden, da ansonsten die Anzahl der toten Zellen steigt und dadurch die Versuchsergebnisse verfälscht werden könnten.

- Die Kammer setzt sich aus 9 großen Quadraten zusammen. Jeweils die Eckquadrate werden ausgezählt.

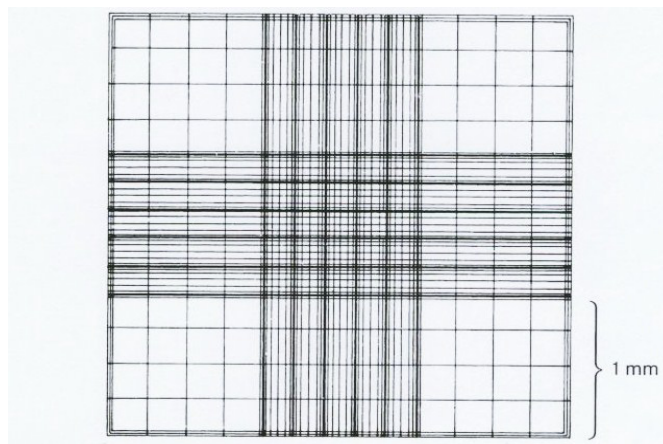


Abb. 10: Einteilung der Neubauer-Zählkammer

[LINDL, 2008]

- Die Zellen, die die Begrenzungslinie des Feldes berühren, werden nur an 2 Seiten in die Zählung miteinbezogen.

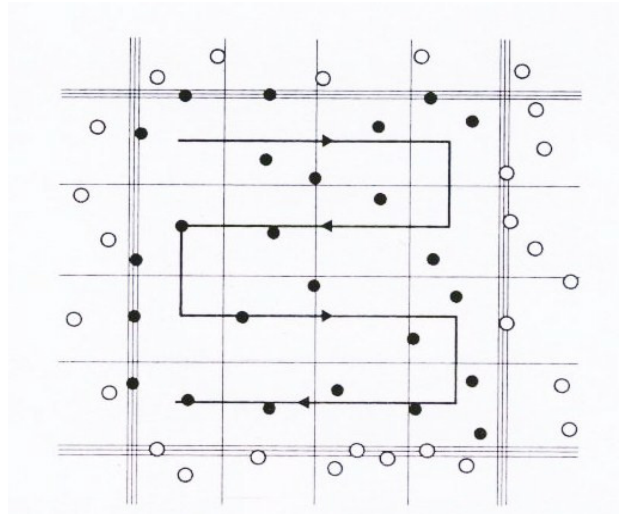


Abb. 11: Äußeres Quadrat der Zählkammer

[LINDL, 2008]

- Unter dem Mikroskop wird nun in den 4 Feldern die Anzahl der enthaltenen Zellen gezählt und daraus der Mittelwert berechnet.
- Der Mittelwert aus den 4 großen Eckquadraten wird durch 2 dividiert. Dieser Vorgang ist notwendig, da 10 μ l Trypanblau mit 10 μ l Medium verdünnt, für die Auszählung davon aber nur 10 μ l entnommen wurden. Anschließend wird der Quotient mit 10^4 (Kammerfaktor) multipliziert. Dies ergibt die Zellkonzentration pro ml Suspension.

3.4.5 Ansetzen der 96-well Platten

- Das vorgewärmte Medium wird in eine Pipettierwanne gefüllt und mit der Multikanalpipette werden 100 μ l in die äußeren Wells pipettiert. Die äußeren Wells fungieren als Rahmen, wobei die obersten drei bei der Vermessung als Leerwertkontrolle dienen.
- 2×10^4 Zellen/ml Medium werden in einer Pipettierwanne vorbereitet und jeweils 100 μ l in die inneren Wells pipettiert.
- Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für 24 h inkubiert.

- Bei den 96-well Platten muss ebenfalls ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Dieser Austausch ist für optimale Bedingungen notwendig. Das Medium wird mittels Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und durch frisches, angewärmtes, ersetzt. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen, die am Boden kleben, dabei nicht verletzt werden.

3.4.6 Inkubation der Zellen mit dem Pflanzenmaterial

3.4.6.1 Inkubation mit *Dianthus versicolor*

Es werden 5 aufsteigende Konzentrationen hergestellt und in Röhrchen pipettiert. Die Drogenextrakte müssen doppelkonzentriert erstellt werden, da sie in der 96-well Platte mit den bereits vorhandenen Medium 1:1 verdünnt werden.

Konz.	1x konz. (µl/1000µl)	1x konz. (µl/100µl)	x2 doppelkonz. x4 (4 Reihen)	Zuschlag	Stock- lösung	Medium
1	0,1 µl	0,01 µl	0,08 µl	+ 0,02 µl	0,1 µl	599,9 µl
3	0,3 µl	0,03 µl	0,24 µl	+ 0,06 µl	0,3 µl	599,7 µl
10	1,0 µl	0,10 µl	0,8 µl	+ 0,20 µl	1,0 µl	599,0 µl
30	3,0 µl	0,30 µl	2,4 µl	+ 0,60 µl	3,0 µl	597,0 µl
100	10,0 µl	1,00 µl	8 µl	+ 2,00 µl	10,0 µl	590,0 µl

Tab. 8: Erstellung der Konzentrationen

3.4.6.2 Inkubation mit *Anserinae herba*

Das Drogenmaterial aus *Potentilla anserina* L. wurde in gepulverter Form verwendet und musste somit zuerst eingewogen werden.

1,3 mg der gepulverten Droge wurde eingewogen und je nach Lösungsverhalten in 1000 µl Medium beziehungsweise in 50 µl Lösungsmittel und 950 µl Medium gelöst. 1,3 mg entsprechen 100 µM in 25 ml. Das Ziel war 1,3 mg in 1 ml zu lösen.

2500 µM1000 µl (Stammlösung)
6 µMX
18 µMX
60 µMX
180 µMX
600 µMX

Tab. 9: Berechnung der Stocklösung

Konzentration	x2 (doppeltkonzentriert) x3 (3 Reihen)	Stocklösung	Medium
1	6 µM	2,4 µl	997,6 µl
3	18 µM	7,2 µl	992,8 µl
10	60 µM	24 µl	976 µl
30	180 µM	72 µl	928 µl
100	600 µM	240 µl	760 µl

Tab. 10: Erstellung der Konzentrationen

3.4.6.3 Beschickung der 96-well Platte

Je Konzentration wurden 100 µl entnommen und in die inneren Wells pipettiert.

A1	A2	A3	•	•	•	•	•	•	•	•	•
•	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	•
•	D1	D1	D1	D1	P1 1	P1 1	P1 1	P2 1	P2 1	P2 1	•
•	D3	D3	D3	D3	P1 3	P1 3	P1 3	P2 3	P2 3	P2 3	•
•	D10	D10	D10	D10	P1 10	P1 10	P1 10	P2 10	P2 10	P2 10	•
•	D30	D30	D30	D30	P1 30	P1 30	P1 30	P2 30	P2 30	P2 30	•
•	D100	D100	D100	D100	P1 100	P1 100	P1 100	P2 100	P2 100	P2 100	•
•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Tab. 11: Darstellung der 96-well Platte mit den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, 100

Legende zu Tab. 11:

A1-A3: Leerwert

K: K ist die Kontrolle, bei der es sich um die Konzentration 0 handelt. Das bedeutet, dass diese Wells anstatt mit dem Pflanzenmaterial nochmals mit 100 µl Medium bestickt wurden.

D1: D1 ist *Dianthus* mit der Konzentration 1. Je 100 µl der zuvor bereiteten Konzentration (siehe Kap. 3.4.6.1 und 3.4.6.2) wurden in die Wells D1 pipettiert.

D3-D100: Der gleiche Vorgang erfolgte mit den Konzentrationen 3, 10, 30 und 100.

Bei P1 und P2 handelt es sich um die Konzentrationen von *Potentillae anserinae herba* 1 und 2. Sowohl die hydro-ethanolischen Extrakte, die wasserlöslichen Extrakte, als auch die Fraktionen und das Rohextrakt wurden auf diese Weise auf zytotoxische Wirkungen getestet.

Alle Versuche wurden mit einer Inkubationszeit von 24 h und 48 h durchgeführt. Mit der in DMSO gelösten Fraktion 5 erfolgten auch Versuche mit kürzerer Inkubationszeit. Je Pflanzenmaterial und je Inkubationszeit wurden 2-3 Versuche durchgeführt. Bei *Dianthus versicolor* erfolgten 4 Versuche je Inkubationszeit. Pro Versuch und je Konzentration, ergaben, wie in Tab. 11 ersichtlich wird, 3-4 Werte.

3.4.7 Messung und Auswertung der Platten

Als Auswertungsmethode wird das EZ4U-Kit verwendet, das auf dem MTT-Assay basiert. Der EZ4U-Test ist ein einfacher, schneller, zuverlässiger und nichtradioaktiver Zellproliferationstest. Der Assay besteht aus der Verbindung 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Bei diesem Test

werden die lebenden Zellen gefärbt, indem das Tetrazoliumsalz von metabolisch aktiven Zellen in violettblaue Formazanderivate umgewandelt wird.

Praktische Durchführung

- Zuerst werden die Zellen optisch unter dem Mikroskop kontrolliert.
- Der EZ4U Kit besteht aus einem Fläschchen Substrat und einer Aktivatorlösung. Unmittelbar vor dem Gebrauch wird 2,5 ml des Aktivators dem Substrat zugefügt, gut vermischt und 1:10 mit α -Medium verdünnt.
- Das Medium in den Platten wird abgesaugt und mit der Multikanalpipette durch 100 μ l EZ4U Lösung ersetzt.
- Die ersten drei Wells (A1, A2, A3) stellen den Leerwert dar und werden auch mit der Kitlösung bestickt.
- Die Platte wird für etwa eine Stunde im Brutschrank inkubiert.
- Im Photometer wird die Absorption bei 450 nm und 620 nm als Referenzwellenlänge gemessen.
- Die Absorption eines Leerwertes (Mittelwert von A1, A2 und A3 – siehe Tab. 11) wird von den Messwerten abgezogen.

3.5 Verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien und Software

Sterilbank (Variolab), Unterdruckpumpe (Bartelt), Inkubationsschrank (Heracell 150), Zentrifuge (Hettich EBA), Wärmebad für Medien, Waage (Sartorius), Ultraschallbad (Starsonic 35, Liarre), Kühlschrank (Liebherr), Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss), Photometer, Neubauer-Zählkammer mit Objektträgergläschen, Mikrotiterplatten 96-well (Iwaki), Zellkulturflasche 75 cm² (TPP), Zellkulturflasche 25 cm² (Iwaki), Glaspipetten, Pasteurpipetten, Pipettenspitzen verschiedener Volumina, Pipettierwanne 50 ml (Costar), Multikanalpipette, Zentrifugenröhrchen (TPP)

Caco-2 Zellen, α -Medium (Gibco), fetales Kälberserum (PAA), Trypsin (Gibco), PBS (Dulbecco, Lonza), DMSO (Sigma Aldrich), Tween 80 (Sigma Aldrich), EZ4U (Biomedica), Trypanblau (Sigma Aldrich), Ethanol 70%,

Aus dem vom Photometer erhaltenen Messdaten wurden mit dem Programm Microsoft Excel arithmetische Mittelwerte gebildet. Diese wurden durch Abzug des Leerwertes normalisiert und als Prozentwert im Vergleich zur Kontrolle angegeben. Anhand von Säulendiagrammen wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels t-Test mithilfe des Statistikprogrammes SPSS.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der untersuchten Präparate anhand von Säulendiagrammen dargestellt und beschrieben. Die x-Achse stellt die Konzentration der Droge bzw. des LM in $\mu\text{M/L}$ (Kontrolle: 0) dar. Die y-Achse zeigt die Prozentwerte im Vergleich zur Kontrolle. 24 h Inkubationszeit ist mit einer blauen Säule dargestellt, 48 h mit einer Roten. Bei Fraktion 5 wurden auch Versuche mit 6 h Inkubationszeit durchgeführt, diese sind als grüne Säulen ersichtlich.

Je nach Irrtumswahrscheinlichkeit wurde die Signifikanz in unterschiedliche Niveaus eingestuft:

- Signifikant: $< 5\%$ ($p < 0,05$): (*)
- Hoch signifikant: $< 1\%$ ($p < 0,01$): (**)
- Höchst signifikant: $< 0,1\%$ ($p < 0,001$): (***)

4.1 Lösungsmittel DMSO

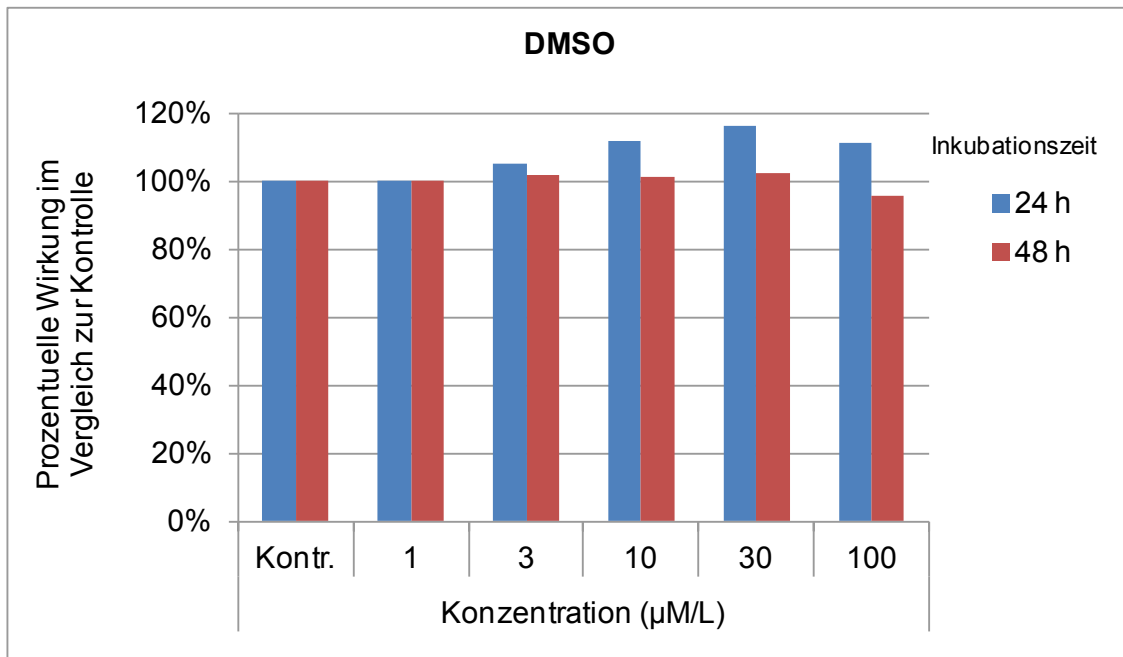


Abb. 12: Graphische Darstellung der Wirkung von DMSO auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	100%	105%	112%	116%	111%
48 h	100%	100%	102%	101%	102%	96%

Tab. 12: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,880	K 1 (µM/L)	0,880	0,000	/
		K 3 (µM/L)	0,923	-0,851	0,427 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,984	-2,090	0,082 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	1,022	-2,833	0,030 (*)
		K 100 (µM/L)	0,976	-1,896	0,107 (n.s.)

Tab. 13: Vergleich des normalisierten Absorptionwertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionwert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,009	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	1,009	0,000	/
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	1,028	-2,251	0,065 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	1,021	-1,675	0,145 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	1,030	-0,854	0,426 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,967	1,325	0,233 (n.s.)

Tab. 14: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

DMSO hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen, außer bei der Konzentration 30 $\mu\text{M/L}$, und der Inkubationsdauer 24 h: Dort war die Zunahme signifikant gegenüber der Kontrolle.

4.2 Lösungsmittel Tween 80

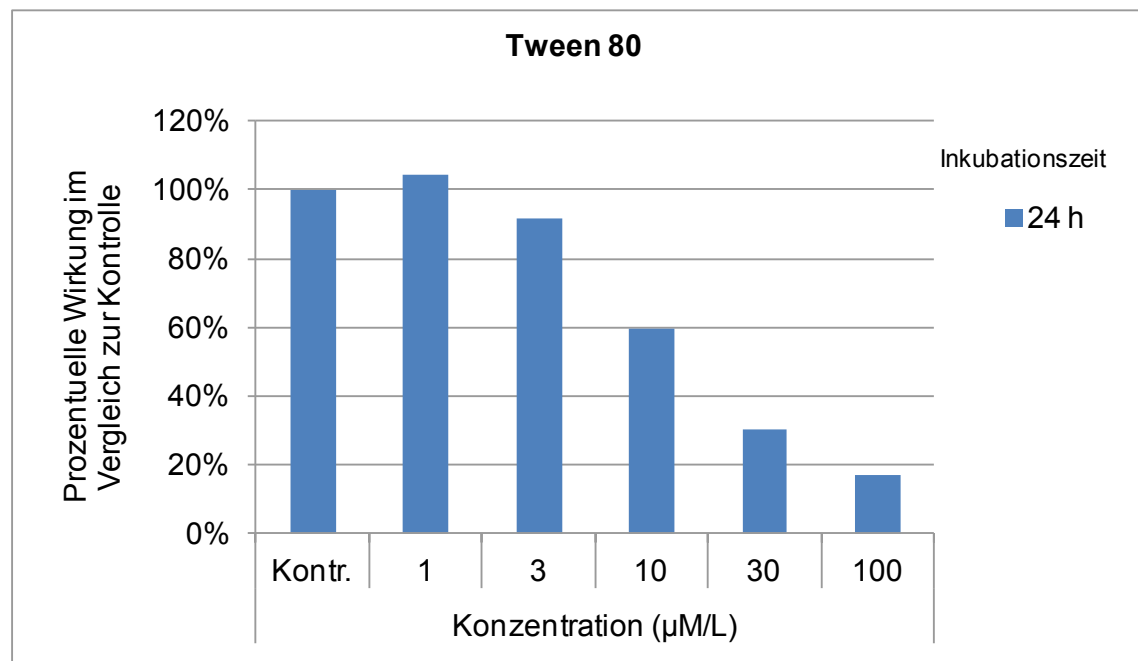


Abb. 13: Graphische Darstellung der Wirkung von Tween 80 auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
24 h	Kontrolle	1	3	10	30	100
	100%	104%	92%	60%	30%	17%

Tab. 15: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,593	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,619	-0,320	0,765 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,545	0,561	0,605 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,353	3,303	0,087 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,180	4,831	0,008 (**)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,001	7,608	0,017 (*)

Tab. 16: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Tween 80 führte mit steigender Konzentration zu einer deutlichen Verringerung des Wachstums der Caco-2 Zellen, bei Konzentration 30 $\mu\text{M/L}$ war sie hoch signifikant, bei Konzentration 100 $\mu\text{M/L}$ signifikant.

4.3 *Dianthus versicolor*

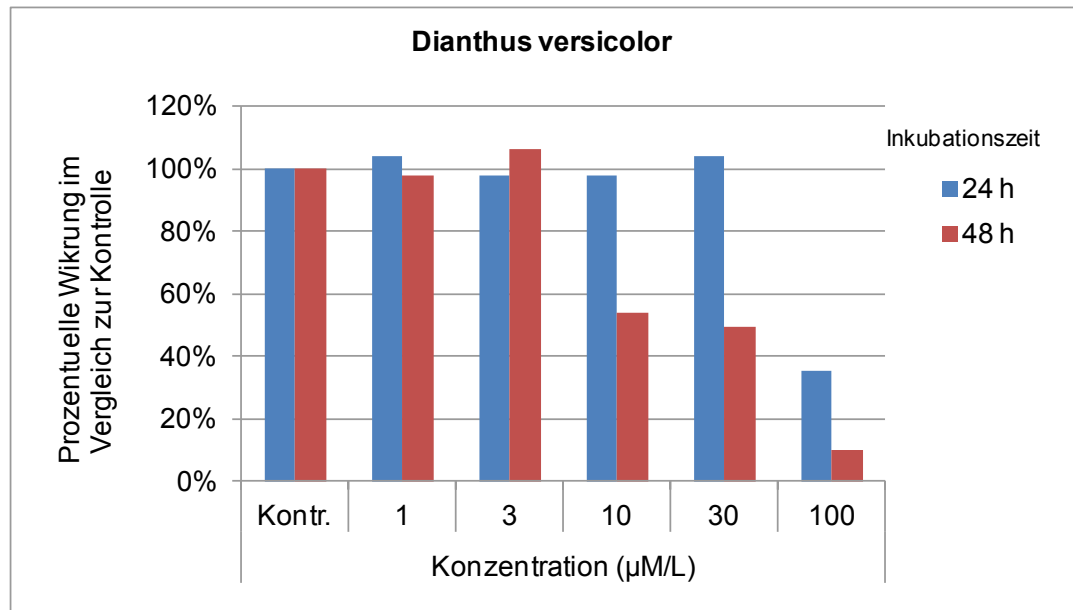


Abb. 14: Graphische Darstellung der Wirkung des Original Water Extract (OWE) von *Dianthus versicolor* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	104%	98%	98%	104%	36%
48 h	100%	98%	106%	54%	50%	10%

Tab. 17: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,641	K 1 (µM/L)	0,668	-0,252	0,802 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,626	0,141	0,889 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,625	0,156	0,877 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,666	-0,178	0,860 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,228	4,773	0,000 (***)

Tab. 18: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,955	K 1 (µM/L)	0,934	0,365	0,721 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	1,013	-0,788	0,444 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,515	3,567	0,007 (**)
		K 30 (µM/L)	0,473	3,473	0,014 (**)
		K 100 (µM/L)	0,097	22,88	0,000 (***)

Tab. 19: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Mit steigender Konzentration und längerer Inkubationsdauer führte die Droge von *Dianthus versicolor* zur Abnahme des Zellwachstums. Bei Versuchen mit der Konzentration 100 µM/L war sie bei den beiden Inkubationsdauern höchst signifikant, bei der längeren Inkubationszeit zusätzlich hoch signifikant bei Versuchen mit den Konzentrationen 10 und 30 µM/L.

4.4 Wasserlöslicher Extrakt 1 der Droge von *Potentilla anserina*

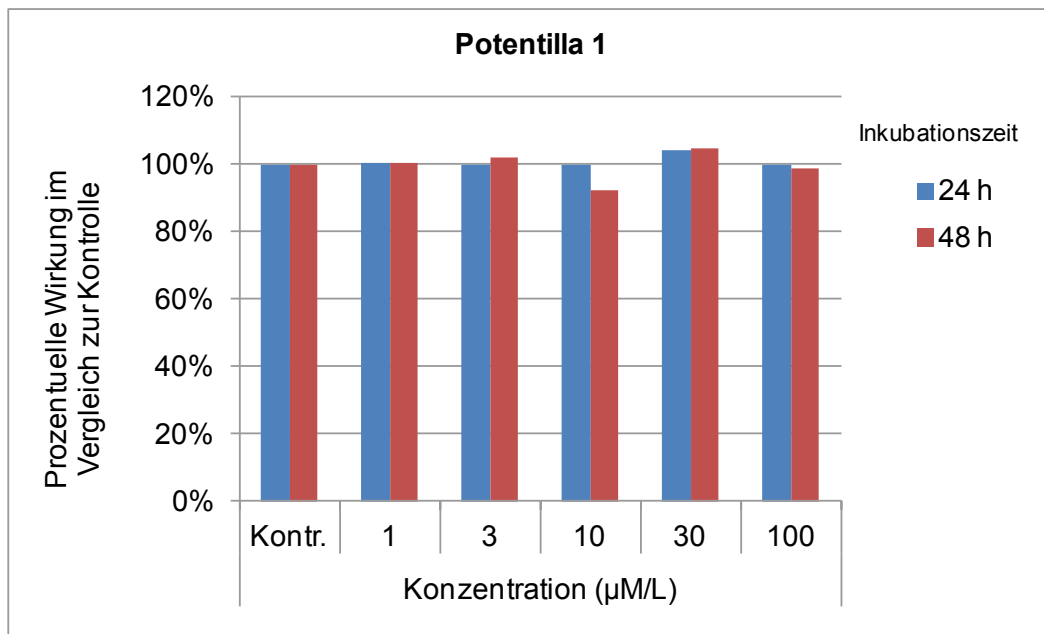


Abb. 15: Wasserlöslicher Extrakt 1 der Droge von *Potentilla anserina*

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	100%	100%	100%	104%	100%
48 h	100%	100%	102%	92%	105%	99%

Tab. 20: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,519	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,520	-0,004	0,997 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,518	0,001	0,999 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,517	0,007	0,994 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,540	-0,079	0,939 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,517	0,008	0,994 (n.s.)

Tab. 21: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,034	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	1,038	-0,063	0,951 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	1,054	-0,309	0,763 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,955	1,685	0,131 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	1,082	-0,686	0,508 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	1,023	0,166	0,871 (n.s.)

Tab. 22: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Der wasserlösliche Extrakt 1 der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Keine der im Versuch verwendeten Konzentrationen bewirkte einen signifikanten Unterschied auf das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle, weder nach 24 h Inkubationszeit noch nach 48 h.

4.5 Wasserlöslicher Extrakt 2 der Droge von *Potentilla anserina*

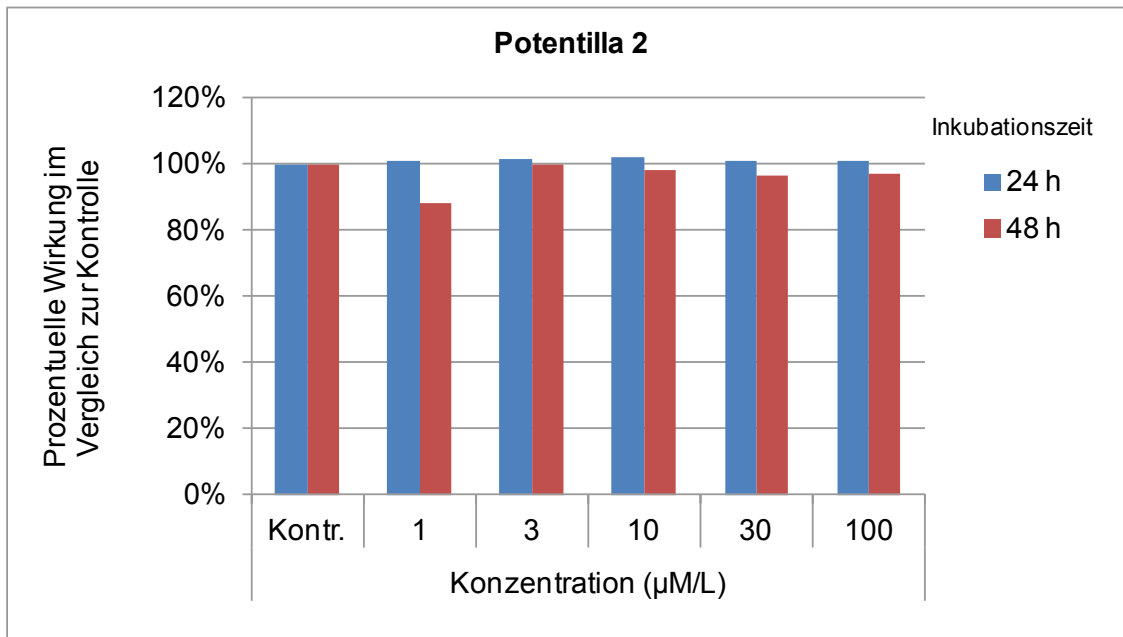


Abb. 16: Graphische Darstellung der Wirkung des wasserlöslichen Extraktes 2 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	101%	102%	102%	101%	101%
48 h	100%	88%	100%	98%	96%	97%

Tab. 23: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,493	K 1 (µM/L)	0,497	-0,014	0,989 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,501	-0,030	0,976 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,503	-0,037	0,971 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,498	-0,017	0,986 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,498	-0,017	0,987 (n.s.)

Tab. 24: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,045	K 1 (µM/L)	0,920	1,752	0,128 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	1,045	0,009	0,993 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	1,027	0,400	0,697 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	1,008	0,868	0,406 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	1,011	0,637	0,543 (n.s.)

Tab. 25: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Der wasserlösliche Extrakt 2 der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Keine der im Versuch verwendeten Konzentrationen bewirkte einen signifikanten Unterschied auf das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle, weder nach 24 h Inkubationszeit noch nach 48 h.

4.6 Hydro-ethanolischer Extrakt 1 der Droge von *Potentilla anserina*, gelöst in DMSO

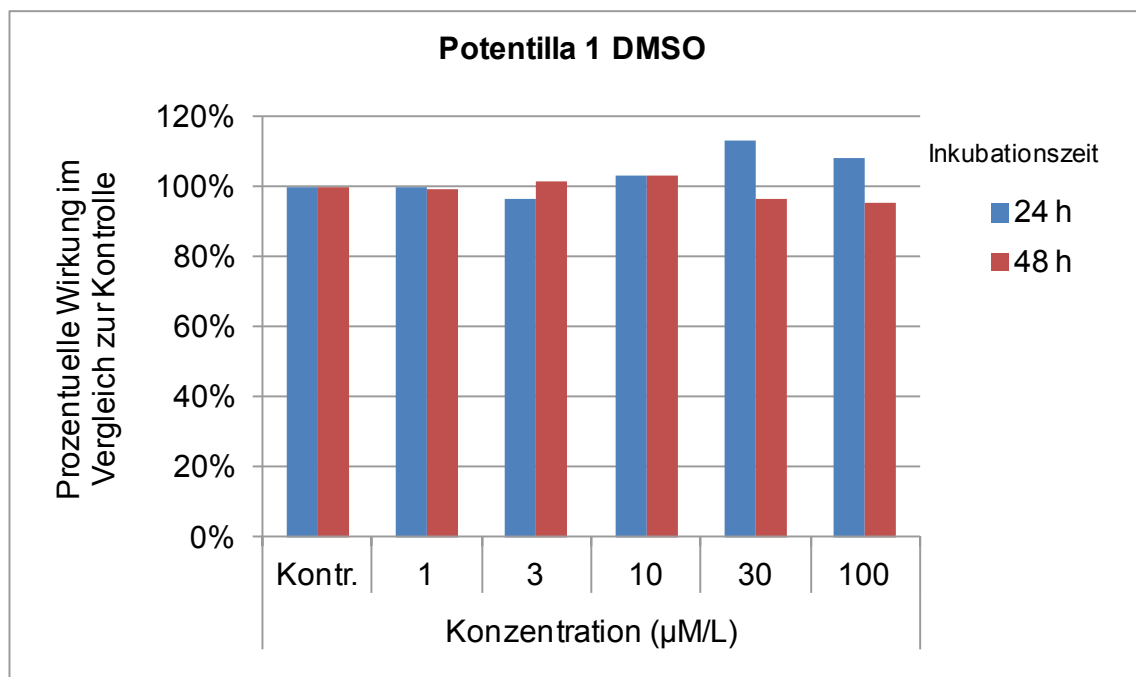


Abb. 17: Graphische Darstellung der Wirkung des in DMSO gelösten Extraktes 1 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	100%	97%	103%	113%	108%
48 h	100%	99%	102%	104%	97%	95%

Tab. 26: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,781	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,782	-0,015	0,988 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,755	0,443	0,665 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,808	-0,427	0,674 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,884	-1,580	0,130 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,846	-1,025	0,320 (n.s.)

Tab. 27: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,124	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	1,119	0,160	0,875 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	1,144	-0,520	0,610 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	1,164	-0,877	0,393 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	1,088	0,642	0,533 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	1,071	1,025	0,321 (n.s.)

Tab. 28: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Der in DMSO gelöste Extrakt 1 der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Keine der im Versuch verwendeten Konzentrationen bewirkte einen signifikanten Unterschied auf das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle, weder nach 24 h Inkubationszeit noch nach 48 h.

4.7 Hydro-ethanolischer Extrakt 2 der Droge von *Potentilla anserina*, gelöst in DMSO

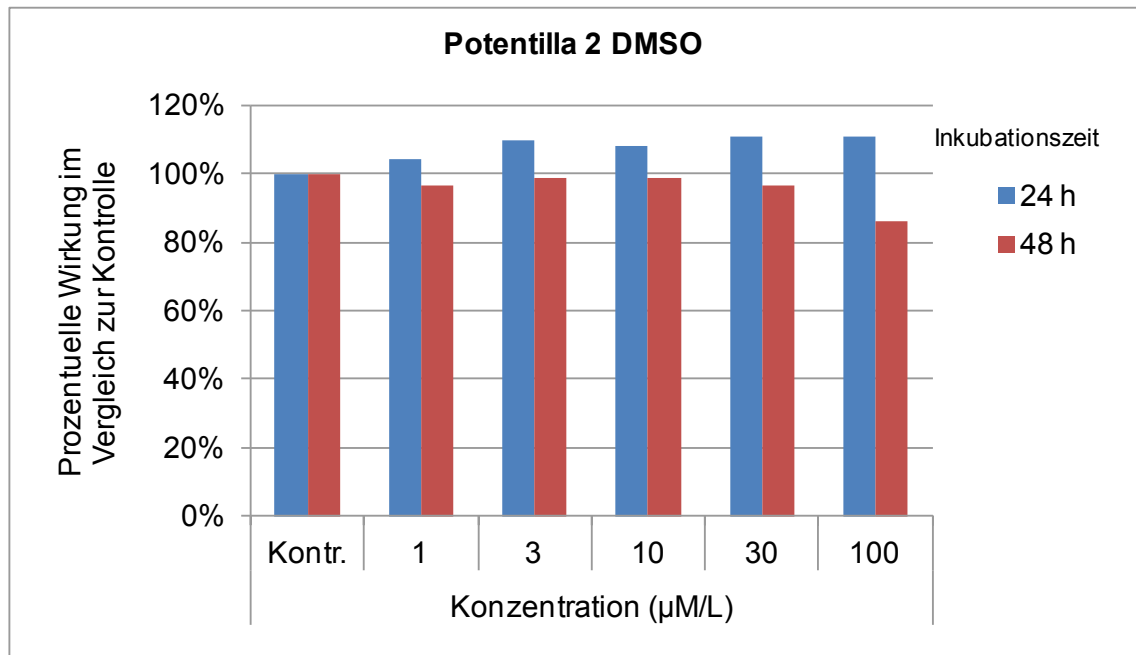


Abb. 18: Graphische Darstellung der Wirkung des in DMSO gelösten Extraktes 2 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	104%	109%	108%	111%	111%
48 h	100%	97%	99%	98%	96%	86%

Tab. 29: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,788	K 1 (µM/L)	0,822	-0,445	0,661 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,862	-0,950	0,354 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,851	-0,844	0,409 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,874	-1,060	0,302 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,873	-1,042	0,310 (n.s.)

Tab. 30: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,093	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	1,058	0,865	0,407 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	1,079	0,439	0,670 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	1,076	0,529	0,608 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	1,053	1,293	0,225 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,940	4,635	0,001 (***)

Tab. 31: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Der in DMSO gelöste Extrakt 2 der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen, außer bei der höchsten Konzentration, 100 $\mu\text{M/L}$, und der längsten Inkubationsdauer, 48 h: dort war die Abnahme höchst signifikant gegenüber der Kontrolle.

4.8 Hydro-ethanolischer Extrakt 1 der Droge von *Potentilla anserina*, gelöst in Tween 80

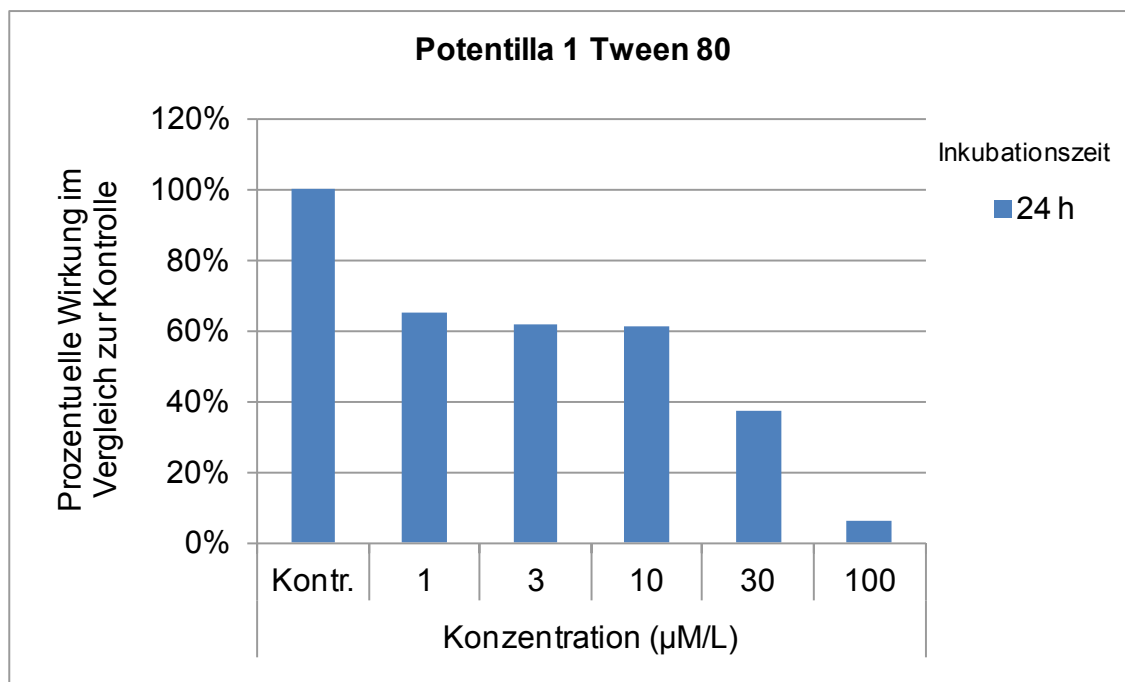


Abb. 19: Graphische Darstellung der Wirkung der in Tween 80 gelösten Droge 1 von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	65%	62%	61%	38%	6%

Tab. 32: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,788	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,512	6,857	0,002 (**)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,487	7,317	0,002 (**)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,482	6,960	0,002 (**)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,297	9,802	0,002 (**)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,050	18,217	0,000 (***)

Tab. 33: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Die in Tween 80 gelöste Droge 1 von *Potentilla anserina* führte bei allen Konzentrationen zu einer hoch oder höchst signifikanten Abnahme des Zellwachstums gegenüber der Kontrolle. Wie in Abb. 13 ersichtlich, besitzt Tween 80 teilweise eine gewisse Eigenaktivität. Daraus lässt sich schließen, dass die negative Auswirkung auf das Zellwachstum zum größten Teil auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist und nicht auf den Extrakt.

4.9 Hydro-ethanolischer Extrakt 2 der Droge von *Potentilla anserina*, gelöst in Tween 80

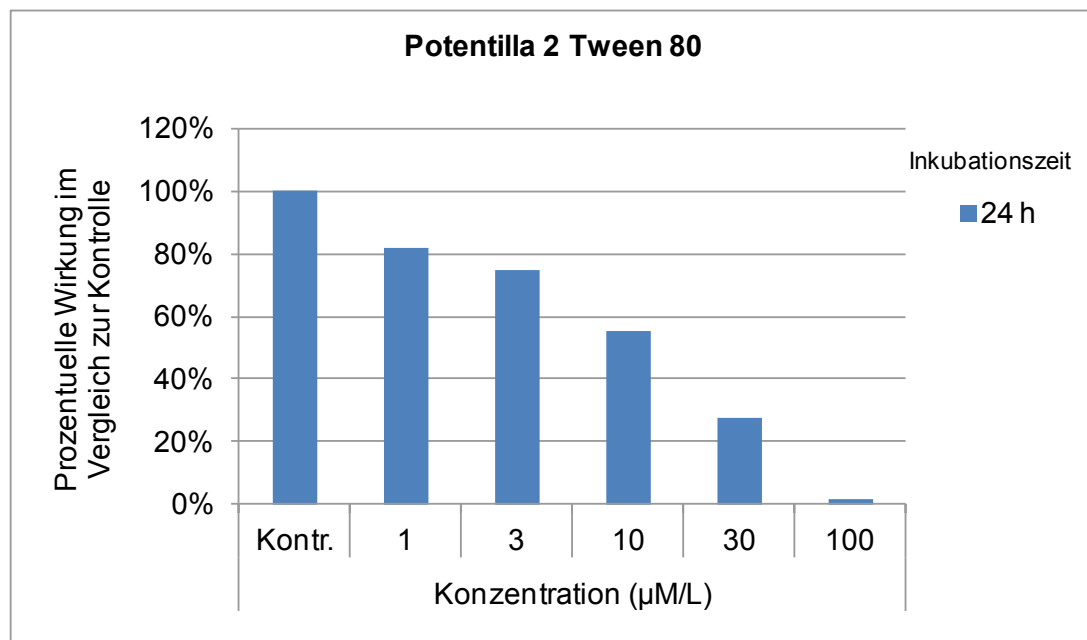


Abb. 20: Graphische Darstellung der in Tween 80 gelösten Droge 2 von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	82%	75%	55%	28%	1%

Tab. 34: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,658	K 1 (µM/L)	0,540	7,079	0,002 (**)
		K 3 (µM/L)	0,490	8,696	0,001 (***)
		K 10 (µM/L)	0,364	8,933	0,001 (***)
		K 30 (µM/L)	0,182	21,370	0,000 (***)
		K 100 (µM/L)	0,009	31,901	0,000 (***)

Tab. 35: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Die in Tween 80 gelöste Droge 2 von *Potentilla anserina* führte bei allen Konzentrationen zu einer hoch oder höchst signifikanten Abnahme des Zellwachstums gegenüber der Kontrolle. Auch hier zeigt sich, wie bei Abb. 19, dass der hemmende Einfluss auf das Zellwachstum hauptsächlich durch einen starken Lösungsmittelleffekt bedingt ist.

4.10 Rohextrakt der Droge von *Potentilla anserina*

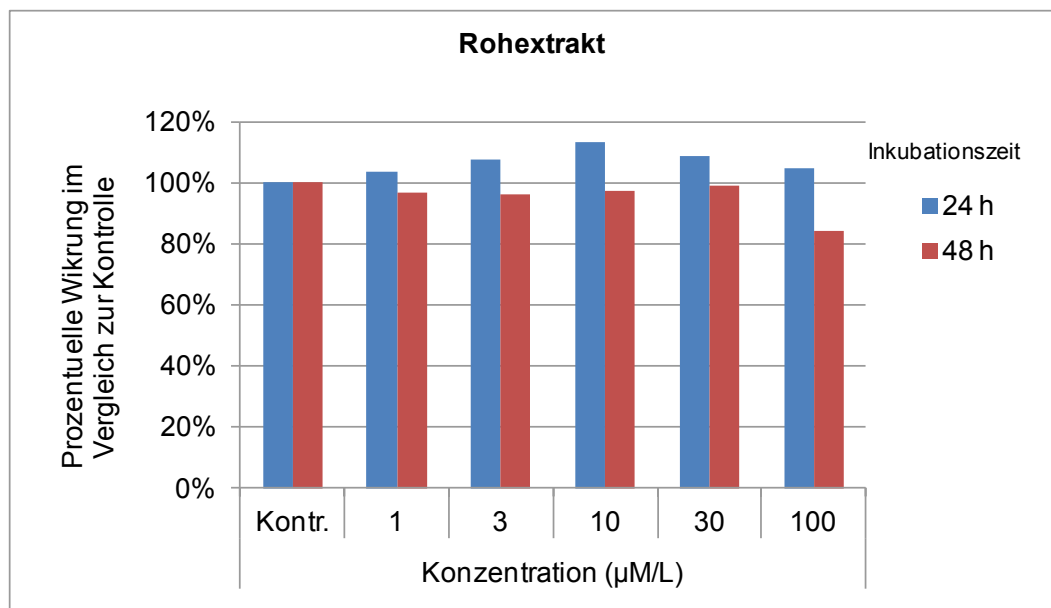


Abb. 21: Graphische Darstellung der Wirkung des Rohextraktes von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	104%	108%	113%	109%	105%
48 h	100%	96%	96%	97%	99%	84%

Tab. 36: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,721	K 1 (µM/L)	0,747	-0,231	0,819 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,777	-0,538	0,594 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,817	-0,985	0,331 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,783	-0,640	0,526 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,757	-0,340	0,736 (n.s.)

Tab. 37: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,016	K 1 (µM/L)	0,980	0,496	0,623 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,978	0,535	0,597 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,988	0,401	0,691 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	1,009	0,101	0,920 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,858	2,062	0,048 (*)

Tab. 38: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Der Rohextrakt der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen, außer bei der höchsten Konzentration, 100 µM/L, und der längsten Inkubationsdauer, 48 h: dort war die Abnahme signifikant gegenüber der Kontrolle.

4.11 Fraktion 1 der Droge von *Potentilla anserina*

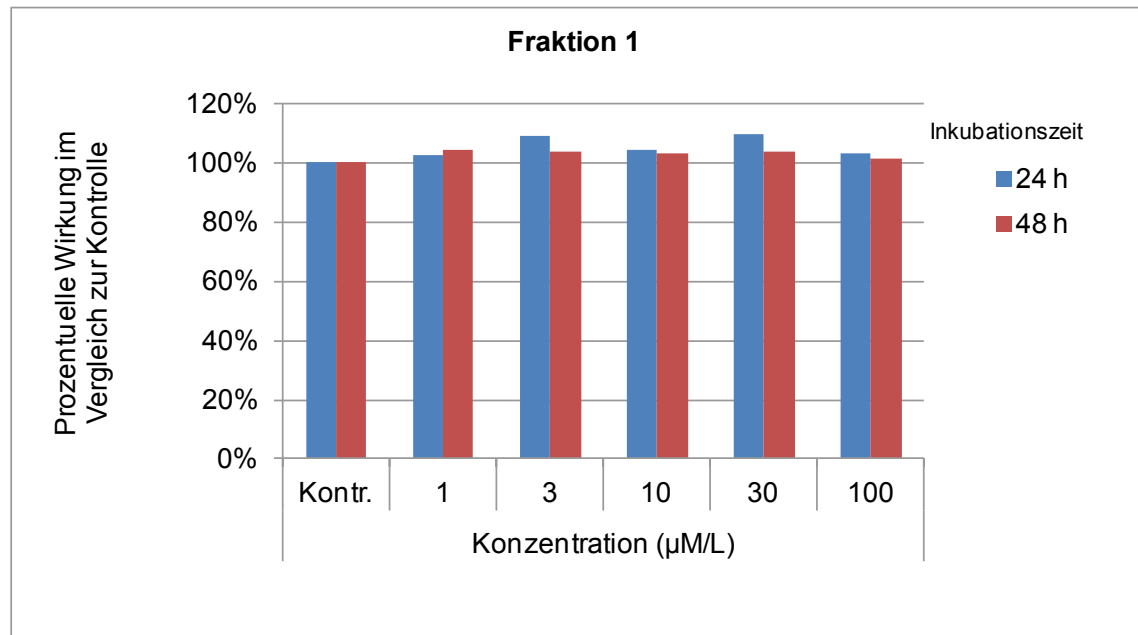


Abb. 22: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 1 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	103%	109%	104%	110%	103%
48 h	100%	104%	104%	103%	104%	101%

Tab. 39: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,857	K 1 (µM/L)	0,880	-0,210	0,836 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,933	-0,754	0,464 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,895	-0,342	0,737 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,940	-0,880	0,394 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,886	-0,337	0,741 (n.s.)

Tab. 40: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,1271	K 1 (µM/L)	1,175	-1,164	0,267 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	1,171	-1,251	0,235 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	1,161	-0,763	0,460 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	1,172	-0,975	0,349 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	1,140	-0,281	0,784 (n.s.)

Tab. 41: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Die Fraktion 1 der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Keine der im Versuch verwendeten Konzentrationen bewirkte einen signifikanten Unterschied auf das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle, weder nach 24 h Inkubationszeit noch nach 48 h.

4.12 Fraktion 2 der Droge von *Potentilla anserina*

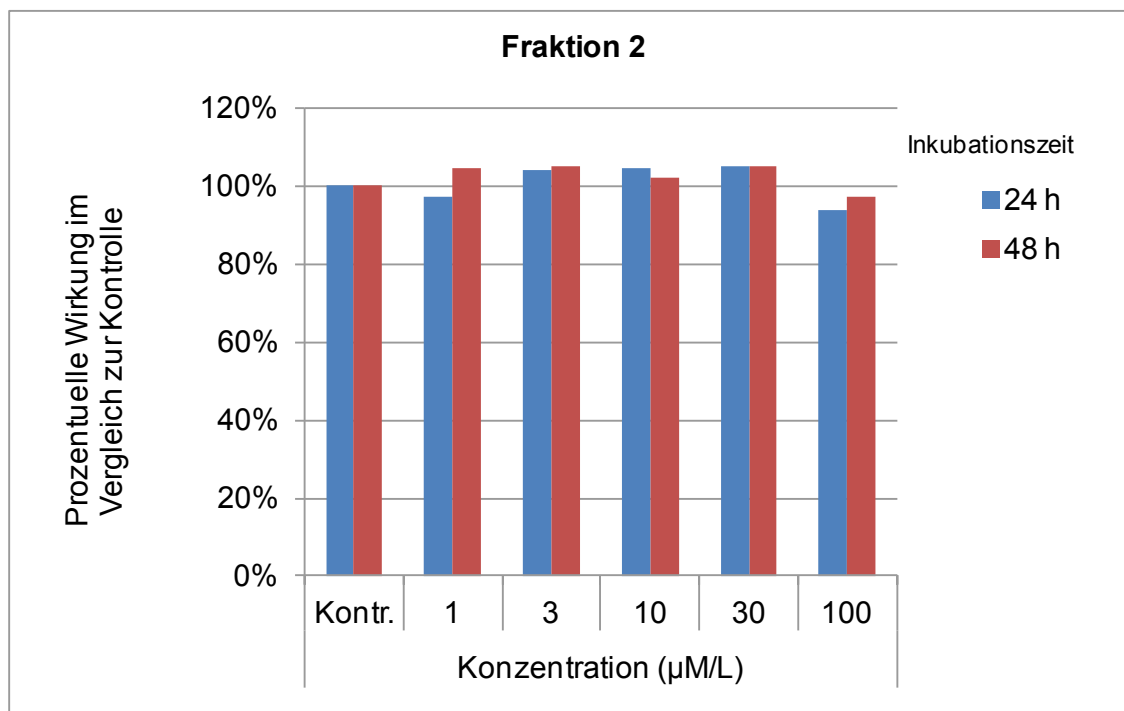


Abb. 23: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 2 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	97%	104%	105%	105%	94%
48 h	100%	105%	105%	102%	105%	97%

Tab. 42: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,864	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,840	0,257	0,800 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,899	-0,412	0,685 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,903	-0,450	0,657 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,909	-0,482	0,635 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,809	0,588	0,563 (n.s.)

Tab. 43: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	1,133	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	1,188	-1,887	0,097 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	1,188	-1,937	0,091 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	1,155	-0,608	0,557 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	1,193	-1,605	0,139 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	1,102	0,805	0,441 (n.s.)

Tab. 44: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Die Fraktion 2 der Droge hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Keine der im Versuch verwendeten Konzentrationen bewirkte einen signifikanten Unterschied auf das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle, weder nach 24 h Inkubationszeit noch nach 48 h.

4.13 Fraktion 3 der Droge von *Potentilla anserina*

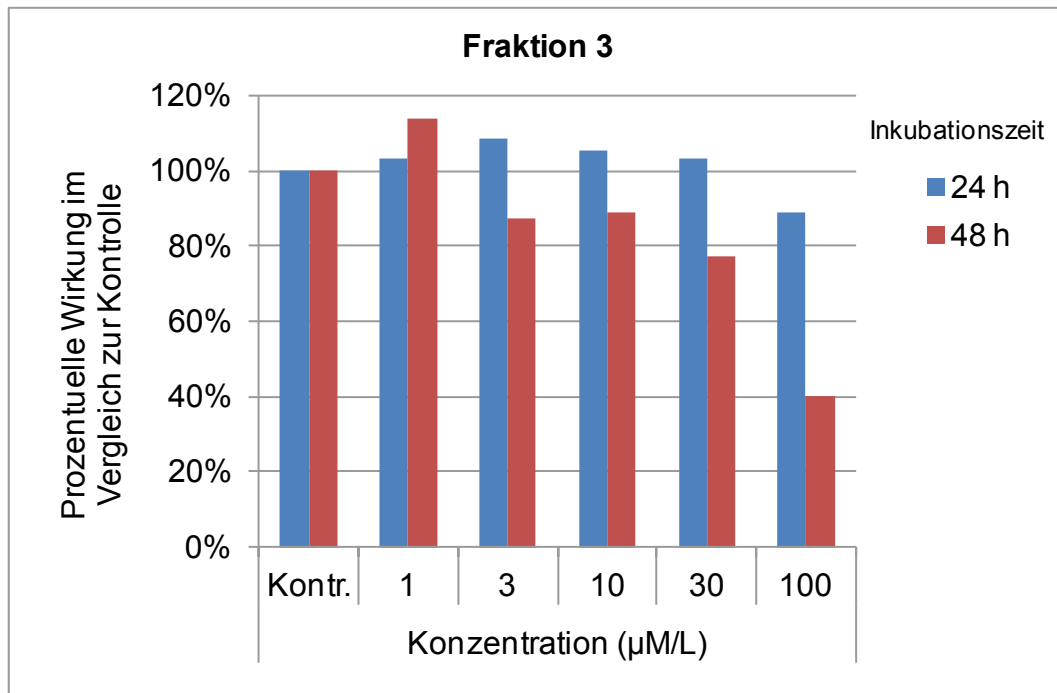


Abb. 24: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 3 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	103%	109%	106%	103%	89%
48 h	100%	114%	87%	89%	77%	40%

Tab. 45: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	P-Werte
Kontrolle	0,933	K 1 (µM/L)	0,964	-0,426	0,676 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	1,015	-1,054	0,308 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,985	-0,728	0,477 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,964	-0,421	0,679 (n.s.)
		K 100 (µM/L)	0,829	1,259	0,226 (n.s.)

Tab. 46: Vergleich des normalisierten Absorptionwertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionwert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,846	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,962	-1,762	0,093 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,737	1,441	0,166 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,753	1,457	0,161 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,651	2,828	0,010 (**)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,338	9,903	0,000 (***)

Tab. 47: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Die Fraktion 3 der Droge hatte nach einer Inkubationszeit von 48 h bei höheren Konzentrationen einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Konzentration 30 führte zu einer hoch signifikanten Abnahme des Zellwachstums, Konzentration 100 zu einer höchst signifikanten, auf weniger als die Hälfte des Werts der Kontrolle. Eine Inkubationszeit von 24 h war offenbar zu kurz, um diesen Effekt zu zeigen: Keine der im Versuch verwendeten Konzentrationen bewirkte einen signifikanten Unterschied auf das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle.

4.14 Fraktion 4 der Droge von *Potentilla anserina*

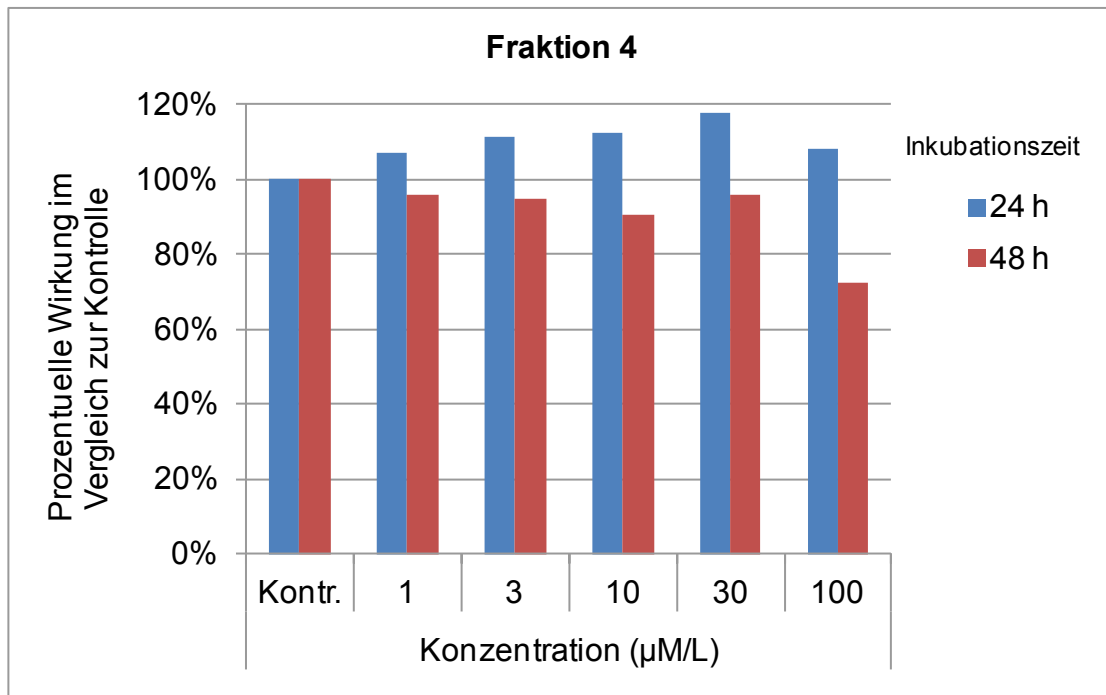


Abb. 25: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 4 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
24 h	100%	107%	111%	112%	118%	108%
48 h	100%	96%	95%	90%	96%	72%

Tab. 48: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,959	K 1 (µM/L)	1,027	1,591	0,138 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	1,067	-2,100	0,034 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	1,077	-2,702	0,019 (*)
		K 30 (µM/L)	1,131	-3,875	0,002 (**)
		K 100 (µM/L)	1,038	-1,652	0,125 (n.s.)

Tab. 49: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,922	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,885	0,641	0,530 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,872	0,801	0,435 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,833	1,570	0,136 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,883	0,671	0,512 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,667	4,058	0,001 (***)

Tab. 50: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Die Fraktion 4 der Droge zeigte einen besonderen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Nach 24 h Inkubationszeit zeigte Konzentration 10 einen signifikanten und Konzentration 30 einen hoch signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Sie hatten höhere Absorptionswerte, also einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum. Der Effekt war auch bei den geringeren Konzentrationen (1 und 3) und der Höchsten (100) gegeben, jedoch nicht auf Signifikanzniveau. Nach 48 h Inkubationszeit hingegen war der Absorptionswert für den Versuch mit der höchsten Konzentration, 100, höchst signifikant geringer als bei der Kontrolle.

4.15 Fraktion 5 der Droge von *Potentilla anserina*

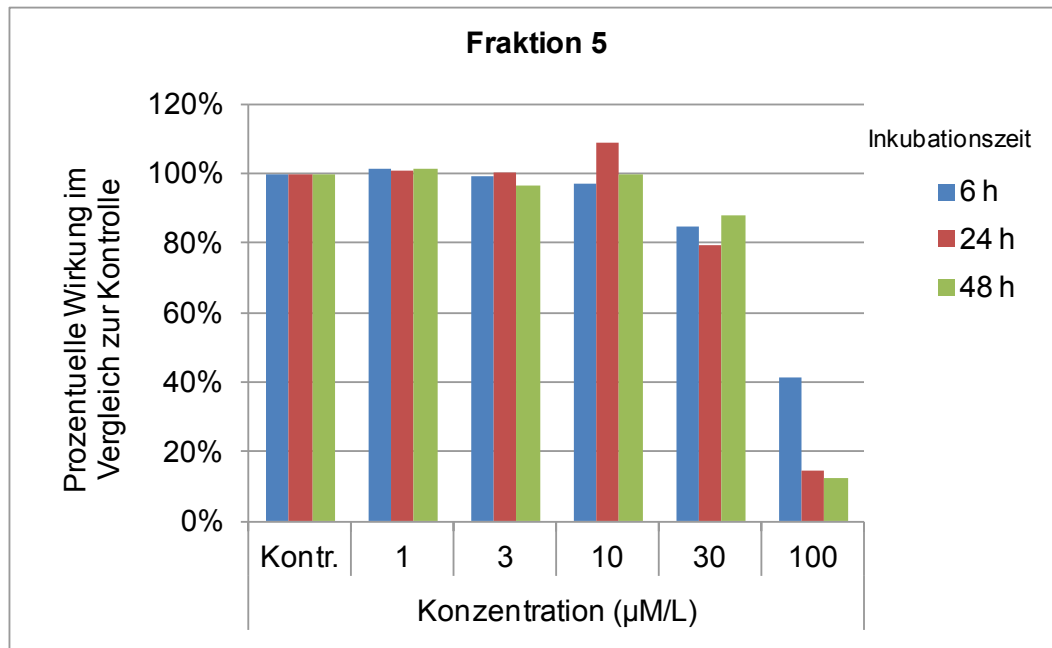


Abb. 26: Graphische Darstellung der Wirkung von Fraktion 5 der Droge von *Potentilla anserina* auf das Wachstum der Caco-2 Zellen

	Konzentration (µM/L)					
	Kontrolle	1	3	10	30	100
6 h	100%	101%	99%	97%	85%	41%
24 h	100%	101%	100%	109%	79%	14%
48 h	100%	101%	97%	100%	88%	13%

Tab. 51: Angabe der prozentuellen Wirkung im Vergleich zur Kontrolle

Werte (6 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,806	K 1 (µM/L)	0,816	-0,544	0,593 (n.s.)
		K 3 (µM/L)	0,799	0,360	0,723 (n.s.)
		K 10 (µM/L)	0,783	1,584	0,131 (n.s.)
		K 30 (µM/L)	0,682	7,620	0,000 (***)
		K 100 (µM/L)	0,332	21,129	0,000 (***)

Tab. 52: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 6 h

Werte (24 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,598	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	0,603	-0,039	0,969 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,600	-0,020	0,984 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,650	-0,430	0,671 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,475	1,057	0,302 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,086	5,560	0,000 (***)

Tab. 53: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 24 h

Werte (48 h)				t-Werte	p-Werte
Kontrolle	0,991	K 1 ($\mu\text{M/L}$)	1,003	-0,161	0,874 (n.s.)
		K 3 ($\mu\text{M/L}$)	0,959	0,378	0,709 (n.s.)
		K 10 ($\mu\text{M/L}$)	0,987	0,051	0,960 (n.s.)
		K 30 ($\mu\text{M/L}$)	0,873	1,647	0,114 (n.s.)
		K 100 ($\mu\text{M/L}$)	0,125	11,25	0,000 (***)

Tab. 54: Vergleich des normalisierten Absorptionswertes einer Konzentration zum normalisierten Absorptionswert der Kontrolle mittels t-Test bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 48 h

Hier wurde auch eine kürzere Inkubationszeit von nur 6 h untersucht. Sie führte ebenso wie die beiden anderen Inkubationszeiten von 24 h und 48 h zu einer höchst signifikanten Abnahme des Absorptionswertes, als Indikator für das Zellwachstum, bei den Versuchen mit der Konzentration 100 ($\mu\text{M/L}$), der Höchsten. Im Unterschied zu den beiden anderen Inkubationszeiten war jedoch die Abnahme des Absorptionswertes auch bei den Versuchen mit der Konzentration 30 ($\mu\text{M/L}$), der Zweithöchsten, ebenso höchst signifikant.

5 Diskussion der Ergebnisse

Zwei Einschränkungen betreffen diese Ergebnisse:

Die Abweichungen der Messwerte voneinander waren relativ hoch. Dadurch wurden Trends verschwommener, wo z.B. eine Abnahme mit höherer Dosiskonzentration erkennbar, erreichte sie bei den ganz Hohen Signifikanzniveau; nur die Mittleren zeigten diesen Trend aber eben noch keine Signifikanz.

Des Weiteren brachten die verwendeten organischen Lösungsmittel ihre eigene Fehlerrate ein, neben ihrem eigenen Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen. Bei Tween 80 war dieser Effekt eindeutig und stark: Mit steigender Konzentration wurde das Wachstum immer stärker gehemmt, so stark das die Aussagen bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h getroffen werden konnten. Versuche mit der sonst üblichen längeren Inkubationszeit von 48 h wurden erst gar nicht durchgeführt. Bei DMSO ist die Lage verzwickter: Bei einer Inkubationszeit von 24 h ergibt sich eine leichte Erhöhung des Zellwachstums, die bei der Konzentrationsstufe 30 ihr Maximum erreicht. Dort ist sogar der Unterschied zum Kontrollwert signifikant. Bei den beiden benachbarten Konzentrationsstufen – 10 und 100 – sind die Werte noch immer höher als bei der Kontrolle, aber der Unterschied ist nicht signifikant, wenn auch die p-Werte nicht weit von der Signifikanzgrenze entfernt liegen. So eine angedeutete Optimumskurve, die den (störenden) Einfluss des Lösungsmittels anzeigt, ist schwerer zu berücksichtigen bei der Beurteilung der Messwerte der in DMSO gelösten Drogenanteile als einen eindeutige wie bei Tween 80. Nach 48 h Inkubationsdauer hingegen zeigt DMSO bei keiner Konzentrationsstufe einen Einfluss.

5.1 *Dianthus versicolor*

Der Effekt der Droge von *Dianthus versicolor* zeigte eine negative Auswirkung auf das Wachstum der Caco-2 Zellen, sowohl was die Inkubationsdauer als

auch die Konzentrationsstufe betrifft. Nach 24 h Inkubation zeigte die höchste Konzentrationsstufe einen höchst signifikanten Einfluss im Vergleich zur Kontrolle, ebenso nach 48 h. Nach 48 h war aber bereits der Einfluss der nächsthöheren Konzentrationsstufen, 10 und 30, hoch signifikant gegenüber der Kontrolle.

5.2 *Potentilla anserina*

Der Rohextrakt hatte nur bei der höchsten Konzentration und der längeren Inkubationsdauer einen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum, es war gegenüber der Kontrolle verringert. Dass die mittleren Konzentrationsstufen nach 24 h Inkubationsdauer das stärkste Zellwachstum, aber nach 48 h das schwächste zeigen dürfte ein Artefakt sein. Diese Trends erreichen auch kein Signifikanzniveau.

Die Fraktionen 1 und 2 verhalten sich gleich, sie sind wirkungslos, es gibt keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Bei Fraktion 3 hingegen deutet sich bei einer Inkubationsdauer von 48 h bereits bei den Konzentrationsstufen 3 und 10 eine Abnahme an, die dann bei der Konzentrationsstufe 30 hoch signifikant ist, und bei der Konzentrationsstufe 100 höchst signifikant: Dort beträgt der EZ4U Absorptionswert weniger als die Hälfte des Kontrollwerts.

Schwierig ist die Interpretation des Einflusses der Fraktion 4: Bei einer Inkubationsdauer von 24 h sind die EZ4U Absorptionswerte bei der Konzentrationsstufe 10 signifikant, bei der Konzentrationsstufe 30 sogar hoch signifikant höher als bei der Kontrolle, nicht jedoch bei der höchsten Konzentrationsstufe (100) sowie bei den beiden niedrigsten (1 und 3). Wieder ist hier eine Optimumskurve angedeutet, deren Scheitel einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle darstellt, ähnlich wie es bei den Versuchen mit DMSO der Fall war. Vielleicht gibt es einen unspezifischen Effekt auf die Zugabe von Stoffen, denen die Caco-2 Zellen in der Zellkultur bisher nicht ausgesetzt waren, einen gewissen Stimulus bei mittleren bis höheren Konzentrationen.

Nach 48 h ist aber bei der höchsten Konzentrationsstufe (100) der Einfluss der Fraktion 4 auf das Zellwachstum höchst signifikant negativ auf das Zellwachstum.

Fraktion 5 wurde auch bei einer sehr kurzen Inkubationsdauer von nur 6 h getestet. Der Effekt war ähnlich dem bei längerer Inkubation 24 h bzw. 48 h. Die höchste Konzentrationsstufe (100) hatte die deutlich geringsten EZ4U Absorptionswerte, und wies einen höchst signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Bei der Inkubationsdauer von 6 h lagen die Messwerte sehr dicht beieinander. Das mag ein Grund sein, warum der Unterschied hier ebenso höchst signifikant zur Kontrolle war, die EZ4U Messwerte waren kleiner. Bei einer Inkubationsdauer von 24 h war der Mittelwert zwar auch um einiges geringer als bei der Kontrolle. Durch die enorme Streuung der Messwerte hatte dieser Unterschied aber keine statistische Bedeutung.

Beide wasserlöslichen Drogen, 1 und 2 von *Potentilla anserina*, hatten keine Wirkung auf das Zellwachstum der Caco-2 Zellen.

Das Gleiche gilt für die in DMSO gelöste Droge 1 von *Potentilla anserina*, nicht jedoch für die in DMSO gelöste Droge 2: Dort zeigte die höchste Konzentrationsstufe (100) bei der längeren Inkubationsdauer (48 h) einen höchst signifikanten, hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Caco-2 Zellen.

Die in Tween 80 gelösten Drogen 1 und 2, von *Potentilla anserina*, zeigten eine gleichartige, aber stärkere Wirkung auf das Zellwachstum der Caco-2 Zellen wie das Lösungsmittel selber. Während Tween 80 erst bei den beiden höchsten Konzentrationsstufen signifikant hemmend wirkt, ist das bei den darin gelösten Drogen 1 bzw. 2 bereits bei der geringsten Konzentration der Fall. Diese Drogen in diesem Lösungsmittel liefern das eindeutige Ergebnis, dass Tween 80 in Kombination mit den Pflanzenpräparaten einen ungewünschten Effekt auf das Zellwachstum ausübt und somit als Lösungsmittel als ungeeignet eingestuft wird. Das bedeutet, dass *Potentilla anserina* keine zytotoxische Auswirkung hat.

Da bei den Zytotoxizitätsprüfungen Tween 80 die Ergebnisse verfälschte, wurde für alle weiteren nicht wasserlöslichen Extrakte und Fraktionen ein anderes Lösungsmittel gewählt, und zwar DMSO. Dieses verfälschte die Wirkungen nicht durch Eigenaktivität.

6 Schlussbetrachtung

Die Droge von *Dianthus versicolor* hat in der TMM ein sehr breites Verwendungsgebiet. Das zeigt sich auch in der grundsätzlichen Charakterisierung, nach der sie alle drei Lebensprinzipien der TMM (Atem, Galle, Schleim) beeinflussen kann. Das wiederum legt die Vermutung nahe, dass diese breite Palette an Wirkungen auch Unerwünschte beinhalten kann. Der vergleichbare Fall aus der Volksmedizin unserer Breiten ist die Droge des Gänsefingerkrauts (*Potentilla anserina*): Hier sind adstringierende, antimikrobiotische und antimykotische Wirkungen lange bekannt, aber aus Tierversuchen kennt man auch eine kardiotoxische Wirkung.

Eine Gegenüberstellung beider Drogen im Zellkulturversuch zeigt, dass beide eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum haben. Bei der Droge *Dianthus versicolor* ist diese klar von Konzentration und Inkubationsdauer abhängig. Bei der Droge *Anserinae herba* konnte mehr ins Detail gegangen werden, sowohl was die Extrakte als auch die Fraktionen betrifft. Nicht alle wirkten hemmend auf das Zellwachstum. War aber ein Effekt gegeben, dann war er ebenfalls positiv korreliert mit Konzentration und Inkubationsdauer. Dass als allgemeine Aussage – es gab Teilergebnisse wo nur die höchste Konzentrationsstufe bei der längsten Inkubationsdauer das deutlich zeigt (Rohextrakt, in DMSO gelöste Droge 2 von *Potentilla anserina*). Hier ist unter Umständen eine neue Versuchsreihe mit längeren Inkubationszeiten und zusätzlichen höheren Konzentrationsstufen angebracht, um sicherzugehen, dass hier kein Schwellenwert überschritten wurde, sondern, ebenso wie bei anderen Teilergebnissen (z.B. Fraktion 5) die Wirkung genauso mit steigender Konzentration und Inkubationsdauer zunimmt. Das ist aber zu vermuten, da es auf der anderen Seite keine gegenläufigen Trends, also z.B. eine hemmende Wirkung nur bei kurzer Inkubationsdauer, und am deutlichsten bei geringen Konzentrationen gibt.

Zwei Fraktionen zeigten keinerlei hemmende Wirkung auf das Wachstum der Caco-2 Zellen.

Der relativ kleine Stichprobenumfang lieferte keine Probleme bei der Deutung der Ergebnisse, mit Ausnahme von Fraktion 4 bei der kürzeren Inkubationsdauer – ein Kandidat für eine Wiederholung mit mehr Umfang.

Eine Droge der westlichen Wissenschaft mit einer zu vergleichen, die genauso traditionell in Gebrauch ist, aber hinsichtlich Auftrennungsverfahren, Literatur und auch Materialnachschub bestens etabliert ist, hat sich bewährt. Beide wirken ähnlich. Für die Droge *Dianthus versicolor* heisst das, in Anlehnung an die Erkenntnisse über die Wirkung der Droge *Anserinae herba*:

Eine Herstellung von verschiedenen Extrakten und Fraktionen erscheint sinnvoll, um zu testen ob man Anteile findet die nicht wachstumshemmend auf das Wachstum der Caco-2 Zellen wirken.

7 Zusammenfassung

Dianthus versicolor zählt zur Familie der Nelkengewächse und wächst in der Mongolei. In der TMM ist sie eine altbekannte Heilpflanze und wird mit anderen mongolischen Pflanzen gegen Lebererkrankungen verwendet. Neben vielen anderen Einsatzmöglichkeiten wird *Dianthus versicolor* in der Mongolei auch als Kontraktionsmittel der Gebärmutter verwendet.

Potentilla anserina zählt zur Familie der Rosengewächse und kommt in den gemäßigten und kalten Zonen der gesamten Nordhemisphäre vor. In der Volksmedizin ist sie schon sehr lange bekannt und wird seit Jahrhunderten unter anderem bei Dysmenorrhö und bei Entzündungen im Mund sowie als appetitanregendes und verdauungsförderndes Mittel angewendet.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde ein OWE-Extrakt der Droge *Dianthus versicolor* sowie Extrakte und Fraktionen der Droge *Anserinae herba* auf Zytotoxizität getestet.

Bei *Potentilla anserina* waren die verwendeten Drogenmuster unterschiedlicher Abstammung, in dieser Arbeit gekennzeichnet als *Potentillae anserinae herba* 1 und 2. Jeweils ein H₂O-Extrakt und ein EtOH 70 %-Extrakt sowie ein aus *Anserinae herba* 1 hergestelltes Rohextrakt und noch weiter aufgereinigte Fraktionen (1-5) wurden untersucht.

Caco-2 Zellen wurden für 24 h und 48 h, mit 5 unterschiedlichen Konzentrationen der Extrakte und Fraktionen, inkubiert. Bei Fraktion 5 gab es auch Versuche mit kürzerer Inkubationszeit.

Durch diese Versuche wurde ersichtlich, ob die Konzentration der untersuchten Präparate sowie die Inkubationsdauer einen Einfluss auf das Zellwachstum zeigen.

Mit steigender Konzentration und längerer Inkubationsdauer führte die Droge von *Dianthus versicolor* zur Abnahme des Zellwachstums. Beide wasserlöslichen Extrakte der Droge *Anserinae herba* zeigten keine Wirkung auf das Zellwachstum. Das gleiche gilt für das in DMSO gelöste EtOH-Extrakt der Droge *Anserinae herba* 1. Beim EtOH-Extrakt der Droge *Anserinae herba* 2 zeigte die höchste Konzentrationsstufe bei 48 h Inkubationsdauer einen höchst signifikanten, hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum. Der gleiche Effekt konnte beim Rohextrakt der Droge *Anserinae herba* beobachtet werden.

Bei den Fraktionen zeigten sich deutliche Unterschiede. Während Fraktion 1 und 2 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufwiesen, zeigte Fraktion 3 teilweise einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum, wobei die Konzentration als auch die Inkubationszeit von Bedeutung war. Fraktion 4 hatte, abhängig von der Inkubationszeit, sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf das Zellwachstum. Bei Fraktion 5 wurden bereits nach 6 h Inkubationszeit signifikante negative Wirkungen auf das Wachstum der Caco-2 Zellen festgestellt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in hohen Konzentrationen auch bei Heilpflanzen eine toxische Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann. Weitere Untersuchungen wären wünschenswert.

8 Summary

Dianthus versicolor belongs to the carnation family. It grows in Mongolia and is known in Traditional Mongolian Medicine (TMM) as a medicinal plant, used together with other Mongolian plants as a cure for liver diseases. One of its other medicinal uses in Mongolia is to stimulate contractions of the uterus.

Potentilla anserina belongs to the rose family and is distributed in the temperate and cold climates zones of the entire northern hemisphere. It is known in popular medicine for a long time and has been used for centuries to cure dysmenorrhoea, oral inflammations and as a stimulator for appetite and digestion, to name only some applications.

Within the framework of this diploma thesis, an OWE-extract of the drug *Dianthus versicolor* as well as extracts and fractions of the drug *Anserinae herba* were tested for cytotoxicity.

The drug samples used from *Potentilla anserina* had a different origin, thus designated in this thesis as *Potentillae anserinae herba* 1 and 2. An H₂O extract as well as an EtOH 70% extract was made from each. In addition, a raw extract and additionally cleaned up fractions (1-5) were made from *Anserinae herba* 1.

Caco-2 cells were incubated for 24 h and 48 h, with 5 different concentrations of the extracts and fractions. Additional experiments with a shorter incubation time were made for fraction 5.

These experiments showed that the concentrations of the investigated preparations as well as the incubation time had an influence on cell growth.

With an increase in concentration and an increase in incubation time, the drug *Dianthus versicolor* caused a decrease of cell growth. Both water soluble extracts of the drug *Anserinae herba* showed no effect on cell growth. The same is the case for the EtOH-extract, dissolved in DMSO, of the drug

Anserinae herba 1. The EtOH extract of the drug *Anserinae herba* 2, at the highest concentration tested and an incubation time of 48 h, showed an extremely significant inhibiting influence on cell growth. The same effect was observed for the raw extract of the drug *Anserinae herba*.

The fractions showed clear differences. While fractions 1 and 2 showed no significant difference to the control, fraction 3 showed in some cases an inhibiting influence on cell growth, depending on concentration and incubation time. Fraction 4 had positive as well as negative effects on the cell growth, depending on incubation time. Fraction 5 showed already after an incubation time of only 6 h significant negative effects on the growth of Caco-2 cells.

Concluding, it can be said that at high concentrations, a toxic effect cannot be excluded for medicinal plants. Further investigations would be desirable.

9 Literaturverzeichnis

ADAM L, AEDTNER D, AEDTNER I, ADLER C. Pflanzeninhaltsstoffe. In: Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaus. Band 1 (Verein für Arznei- und Gewürzpflanzen SALUPLANTA, Hrsg). Bernburg, 2009; 66.

BÖHMIG F, CHROBOK R. In: Dianthus. Neumann Verlag, Radebeul 1, 1963; 11.

BOGUSLAVSKAYA LI, DEM'YANENKO SI, SALAM DK, SOBOLEVA VA. C-Glycoside of Dianthus versicolor. Chemistry of Natural Compounds 1983; 19: 746-747.

ERIKSSON O. Reproduction and clonal growth in: Potentilla anserina L. Oecologia 1985; 3: 378.

FISCHER G, KRUG E. In: Heilkräuter und Arzneipflanzen. 7. Auflage. Haug Verlag, Heidelberg, 1984; 84.

FROHNE D, JENSEN U. In: Systematik des Pflanzenreichs. 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena New York, 1998;

GRUBOV V. Dianthus versicolor Fisch. In: Key to the vascular plants of Mongolia. Vol. 1. Science Publishers Inc: Enfield (NH), USA, 2001; 226.

HABERMEHL G, HAMMANN P, KREBS H, TERNES. In: Naturstoffchemie Eine Einführung. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin, 2008; 467.

HÄNSEL R, KELLER K, RIMPLER H, SCHNEIDER G. Potentilla. In: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Band 6, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1994; 254-258.

KLETTER CH, GLASL S, THALHAMMER T, NARANTUYA S. Traditional Mongolian Medicine – A Potential for Drug Discovery. The Austrian Journal of Pharmaceutical Sciences 2008; 76: 49-63.

LIGAA U, DAVAASUREN B, NINJIL U. Dianthus versicolor Fisch. In: Medicinal plants of Mongolia used in western and eastern medicine, Bayan Mongol Capital CoLtd., Ulaanbaatar 2006

LINDL T, GSTAUNTHALER G. In: Zell-und Gewebekultur Von den Grundlagen zur Laborbank. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2008; 143/216

MA L, GU YC, WANG JS, HUANG XF, KONG LY. Triterpenoid Saponins from Dianthus versicolor. Journal of Natural Products 2009; 72: 640-644.

MAYR K. Charakterisierung von Sequiterpenlactonen und Flavonoiden aus Saussurea amara Dc. (Asteraceae), Wien, Universität Wien, Diplomarbeit, 2006; 8-9.

MUND A. In: Die Traditionelle Mongolische Medizin Veröffentlichung des International Trust for Traditional Medicine (Mund). Mannheim, 2005;

NUHN P. Saponine. In: Naturstoffchemie. 4. Auflage. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2006; 214.

OBMANN A, RADOVIC T, KLETTER CH, GLASL S. HPLC-MS-Analysis of Flavonoid-C-glycosides in the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor*. *Planta Medica Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research* 2007; 73: 931.

OBMANN A, TSENDAYUSH D, THALHAMMER T, ZEHL M, PHUONG NHA VO T, PUREVSUREN S, NATSAGDORJ D, NARANTUYA S, KLETTER C, GLASL S. Extracts from the Mongolian traditional medicinal plants *Dianthus versicolor* FISCH. and *Lilium pumilum* DELILE stimulate bile flow in an isolated perfused rat liver model. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 131: 555-561.

OBMANN A, WEISZ-PECHER B, RAWNDUZI P, KLETTER C, LEMMENS-GRUBER R, GLASL S. Uterus activity of the Mongolian Medicinal Plant *Dianthus versicolor* Fisch. *The Austrian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 77: 269.

OBMANN A, WERNER I, PRESSER A, ZEHL M, SWOBODA Z, PUREVSUREN S, NARANTUYA S, KLETTER C, Glasl S. Flavonoid C- and O-glycosides from the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch. *Carbohydrate Research* 2011; 346: 1868-1875.

OBMANN A, ZEHL M, PUREVSUREN S, NARANTUYA S, REZNICEK G, KLETTER C, GLASL S. Quantification of flavonoid glycosides in an aqueous extract from the traditional Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* FISCH. *Journal of Separation Science* 2011; 34: 292-298.

PIETTA P.-G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000; 63: 1035-1042.

SCHEK A. Sekundäre Pflanzenstoffe. In: Ernährungslehre kompakt. 3. Auflage. Umschau Zeitschriftenverlag, Sulzbach im Taunus, 2009; 150.

SCHIMMER O, LINDENBAUM M. Tannins with antimutagenic properties in the herb of *Alchemilla* Species and *Potentilla anserina*. *Planta Medica Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research* 1995; 61: 141-145.

SCHLAGER M. Untersuchung der toxischen und spasmolytischen Wirkungen von *Potentilla anserina* L., Wien, Universität Wien, Diplomarbeit, 2008; 55-56.

SCHMITZ S. Der Experimentator Zellkultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2007;

SCHÖNFELDER I, SCHÖNFELDER P. *Potentilla anserina* L. In: Das neue Handbuch der Heilpflanzen. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co KG, Stuttgart, 2004; 358-359.

TOMCZYK M, LESZCZYNSKA K, JAKONIUK P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia* 2008; 79: 592-594.

TOMCZYK M, LATTÉ K. *Potentilla* – A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 122: 184-204.

TUNMANN P, JANKA R. Chemie und Pharmakologie von *Potentilla anserina*. *Arzneimittelforschung* 1955; 5: 20-24.

WEISZ-PECHER B. Untersuchung der Wirkung eines Extraktes aus *Dianthus versicolor* auf die Kontraktilität des Uterus sowie Herz und glattemuskulären Organen., Wien, Universität Wien, Diplomarbeit, 2008; 80.

WICHTL M. *Anserinae herba*. In: Teedrogen und Phytopharmaka. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009; 3-, 87-88.

WYK B, WINK C, WINK M. *Potentilla anserina*. In: Handbuch der Arzneipflanzen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004; 253.

ZHAO YL, CAI GM, HONG X, SHAN LM, XIAO XH. Anti hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserina* L. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 2008; 15: 253-258.

Die Unterlagen für das Verfassen von Kapitel 3.2 wurden mir von Frau Dr. Prinz im Jahr 2009 zur Verwendung für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Aus den Unterlagen geht hervor, dass es sich um einen Auszug aus einem Diplomarbeitsskript von Frau Barbara Horak handelt. Da Frau Dr. Prinz seit 2 Jahren nicht mehr am Institut tätig ist, konnte ich mich bezüglich einer genauen Quellenangabe leider nicht mit ihr in Verbindung setzen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Schmid
 Adresse: Kaiserstraße 63/2/20
 1070 Wien
 Staatsbürgerschaft: Österreich
 Geburtsdaten: 29.06.1982 in Amstetten
 Familienstand: ledig
 Religion: römisch-katholisch
 Telefon: 0676/5237900
 E-Mail: schmidclaudia@gmx.at



Ausbildung

1988 - 1992 Volksschule, Persenbeug
 1992 - 1996 Hauptschule, Persenbeug
 1996 - 1999 Fachschule für wirtschaftliche Berufe, Amstetten
 1999 - 2002 Höhere Bundeslehranstalt für wirtschaftliche Berufe mit Matura, Wien 19.
 seit März 2003 Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien, Wahlschwerpunkt „Psychologie der Ernährung/Ernährungsberatung“

Berufserfahrung

seit April 2008 VIP-Flugbegleiterin bei International Jet Management
 März 2007 – März 2008 Freelance VIP-Flugbegleiterin bei Bannert Air
 April 2005 – Jänner 2008 Promotorin am Flughafen Wien für Young Promotion/Köln
 Sept. 2002 – Dez. 2002 Au pair in Südfrankreich
 1999 – 2005 Promotorin/Hostess bei Entertainment Company, Workart

Praktika

Februar 2008	Praktikum beim Institut für medizinische und sportwissenschaftliche Beratung, Maria Enzersdorf
Juli 2007	Praktikum in der geriatrischen Abteilung des Otto Wagner Pflegezentrums, Wien
Februar 2006	Praktikum bei der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung, Wien

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Sehr gut
Französisch	Grundkenntnisse

Wien, im September 2012